



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**METABOLISMO DEL CARBONO Y RELACIÓN
FUENTE - DEMANDA EN EL CAFETO
(*Coffea arabica* L.)**

LUIS FERNANDO GÓMEZ GIL

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias Área Agraria
Departamento de Ciencias Agronómicas
Medellín, Colombia
2012**

**METABOLISMO DEL CARBONO Y RELACIÓN
FUENTE - DEMANDA EN EL CAFETO
(*Coffea arabica* L.)**

LUIS FERNANDO GÓMEZ GIL

Tesis presentada como requisito parcial para optar
al título de Doctor en Ciencias

Director:

**Ing. Agrónomo Ph.D.
Néstor Miguel Riaño Herrera**

Co-director:

**Ing. Agrónomo Ph.D.
Enrique Martínez Bustamante**

Línea de Investigación:

Fisiología de la Producción Vegetal

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias Área Agraria
Departamento de Ciencias Agronómicas
Medellín, Colombia
2012**

A Sissy mi esposa...su amor, compañía, paciencia e inteligencia han sido, son y serán parte fundamental en mi vida. A mis hijos juanma y rafita que son el mejor regalo que Dios me ha dado. Sus sonrisas, sus afectos y su amor son fuente de energía para cumplir todas las metas propuestas.

A mis padres Jorge y Fanny, y mis hermanos Pilar y Mono.

A José Arcesio, doña Olga, Juancho, Juli y Tere.

Agradecimientos

Deseo expresar mis agradecimientos:

A la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia por brindarme la oportunidad de adelantar los estudios de doctorado.

Al Centro Nacional de Investigaciones de Café - CENICAFÉ - por su apoyo al desarrollo de los estudios doctorales.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias - por la financiación del proyecto 225140520346 y su apoyo a través del programa de formación de doctorados nacionales.

Al director del trabajo Doctor Néstor Miguel Riaño H. por su guía, amistad, colaboración y valiosa dirección durante el transcurso del doctorado.

Al Dr. Miguel-González Meler, del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Illinois (Chicago - USA), por haberme recibido en su laboratorio de Isótopos Estables y Cambio Climático, lugar donde aprendí muchas de las técnicas utilizadas en la presente investigación.

Al Doctor Gabriel Cadena Gómez, ex-director de Cenicafe, por su apoyo y colaboración.

A los Drs. Enrique Martínez y Régulo Cartagena de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por su colaboración y apoyo durante el desarrollo del doctorado.

Al Ing. Mario Franco J. por su gran colaboración y acertadas sugerencias a lo largo de este trabajo de tesis.

Un agradecimiento muy especial a los Ing. Agrónomos Ángela Castaño y Norbey Ibarra. Su amistad, ayuda y aporte de buenas ideas para el desarrollo de este trabajo fue excepcional.

A los Ing. Aristóteles Ortiz, Maria J. Chica y Luz F. Echeverry ya que su oportuna colaboración, sugerencias y consejos en los momentos críticos permitieron el avance y culminación del presente trabajo.

Al Ing. Agrónomo M.Sc. Héctor Chica por su participación en el análisis estadístico.

A mis compañeros y amigos de la Disciplina de Fisiología Vegetal de Cenicafé: Lorena, Rocío, Claudia, Mario, Braian, Anderson ya que en su momento me brindaron su apoyo.

A los compañeros de laboratorio durante la pasantía en la Universidad de Illinois. Su amistad, ayuda y consejo fueron fundamentales para el trabajo allí desarrollado: Javier, Nuria, Charlie, Yaniria, Elena, Michelle y Sarah.

Resumen

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del proceso Fuente-Demanda de carbohidratos en plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo® El Rosario, en diferentes estados de desarrollo, se realizaron tres experimentos bajo condiciones semi-controladas y de campo. Inicialmente se diseñó y validó una metodología de marcación y seguimiento de los principales compuestos del metabolismo bioquímico de los vegetales [material orgánico (*MO*), almidón, azúcares totales, lípidos, proteínas totales y celulosa] y su cuantificación. Se hizo una mezcla de $^{13}\text{CO}_2$ puro y nitrógeno grado 5.0 UAP y se consiguió un aire de concentración de $^{13}\text{CO}_2$ conocido, que al mezclarlo con aire ambiental, permitió el marcaje de las plantas.

En el primer experimento, con el fin de determinar el momento en que las hojas pasan de ser demanda a fuente de carbohidratos, se generaron los datos de relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) del material orgánico (*MO*) en hojas de los nudos 1 al 6, contadas desde el ápice de las ramas, y un ajuste de la *RI* con el área foliar específica ($AFE - \text{cm}^2\text{g}^{-1}$) a las 1.5, 6, 12, 24, 48 y 72 horas posteriores al marcaje con $^{13}\text{CO}_2$. Se obtuvieron los valores integrados diarios de fotosíntesis (*F*) y respiración (*R*) en hojas de los mismos nudos, así como la dinámica del metabolismo reflejada en la *RI* del aire respirado (*Ra*) por las hojas marcadas del nudo 3, las que estuvieron en completa oscuridad por 78 horas. El análisis mostró que las tasas de intercambio gaseoso fueron superiores en hojas entre 30 y 180 días de emergencia (nudos 2 a 5). Las hojas de los nudos 1 (0-30 días de edad) y 6 (150-180 días) mostraron las menores tasas de intercambio gaseoso y la mayor actividad respiratoria se presentó en las hojas de los nudos 2 y 3. Con la metodología utilizada y las determinaciones realizadas no se logró determinar el límite funcional de la hoja entre su condición de importadora y exportadora neta de asimilados ya que se encontró el $^{13}\text{CO}_2$ de marcación en todas las hojas evaluadas. Se observó una clara relación entre las variables de intercambio gaseoso, la oferta ambiental y la edad de las hojas.

El segundo experimento evaluó la exportación e importación de carbohidratos entre hojas, tallos y raíces de plantas completas de ocho meses de edad, de los materiales CX2178 y BH1247, en respuesta a condiciones de temperatura ($T^\circ\text{C}$) diferenciales (15°C , 25°C y 35°C) en fitotrón, a las 1.5, 24 y 48 horas posteriores al marcaje. Hubo un claro comportamiento Fuente-Demanda entre los órganos evaluados. Se encontró que 25°C es la temperatura adecuada para una mejor eficiencia en los procesos fisiológicos, como previamente se ha descrito. El balance entre *F* y *R* (Fotosíntesis Neta - *Fn*) fue de $4598.1 \mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$, mientras para las otras dos temperaturas fue negativo, lo que muestra la incidencia sobre *Coffea* sp. de condiciones inadecuadas de $T^\circ\text{C}$. El metabolismo a los 15°C fue más lento, mostrando que el movimiento de los

compuestos entre órganos, fundamentalmente almidón y azúcares totales, fue menor, mientras a los 35°C las altas tasas enzimáticas exigidas hicieron el metabolismo más rápido, causando igualmente una alteración fisiológica por elevado consumo energético, reflejado en las elevadas tasas respiratorias y en el movimiento de los compuestos evaluados. En general, las proteínas y la celulosa mostraron los valores más bajos de *RI*, seguidos por los lípidos. Cuando hubo diferencias entre genotipos, fueron a favor del material *CX2178*, lo cual se relaciona con su mayor acumulación de materia seca y producción a lo largo de su ciclo de vida.

En el tercer experimento se evaluó bajo condiciones de campo, en los materiales *BH1409* y *CU1970*, el movimiento de los asimilados entre hojas y frutos en tres estados de desarrollo: estado 1 (entre 0 y 8 semanas posteriores a la floración), estado 2 (semanas 9 a 17) y estado 3 (semanas 18 a 26), a las 1.5, 48 y 72 horas posteriores a la marcación. Los frutos de mayor desarrollo (*F3*) obtuvieron las mayores cantidades porcentuales de almidones, proteínas y celulosa, seguidos por los frutos dos (*F2*) y frutos uno (*F1*) respectivamente. Los azúcares estuvieron presentes en iguales cantidades en los tres tipos de frutos, siendo mayor para glucosa y fructosa que para sacarosa, y que muestra la importancia de estos compuestos en las relaciones fuente y demanda de carbohidratos. Como en los anteriores experimentos, hubo un claro comportamiento de exportación (hojas) e importación de asimilados (frutos). La mayor detección de compuestos marcados (*RI*) se observó en almidones y azúcares totales para los *F1*, seguidos por *F2* y *F3*, lo que está de acuerdo con sus necesidades metabólicas y energéticas para su desarrollo y crecimiento. Se encontró estrecha relación entre las tasas de *F* y *R* foliar, las que se midieron en las hojas de los nudos 1 a 5, y la *RI* de acuerdo con la edad de los frutos. En algunas variables hubo diferencias a favor del material *CU1970*, que igualmente concuerda con una mayor producción y acumulación de materia seca frente al material *BH1409*.

Palabras claves: *Coffea* sp.; Relación Isotópica ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$); Fuente-Demanda; Carbohidratos; Eficiencia en el uso del carbono (*EUC*); Productividad.

Abstract

In order to deepen the knowledge of the source-sink process of carbohydrate in of *Coffea arabica* L. var. Castillo[®] El Rosario plants in different development stages, were performed three experiments under field and controlled conditions. Initially a methodology was designed and validated for signature and tracking of biochemical key compounds of plants metabolism [organic matter (*OM*), starch, total sugars, lipids, total proteins and cellulose] and its quantification. Was a mixture of ¹³CO₂ pure and nitrogen 5.0 UAP and achieved an air with ¹³CO₂ known concentration that when mixed with ambient air allowing the plants labeling.

In the first experiment in order to determine when the leaves change from carbohydrate sink to source, data were generated of isotopic composition ($\delta^{13}\text{CO}_2$, $\delta^{12}\text{CO}_2$) of organic matter (*OM*) from 1 to 6 nodes counted from apex of the branches. This was obtained isotope ratio (*IR* - ¹³CO₂/¹²CO₂) and a ratio between *RI* and specific leaf area (*SLA*-cm²g⁻¹) at 1.5, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after labeling with ¹³CO₂. Were obtained daily integrated values of photosynthesis (*F*) and respiration (*R*) in the same nodes leaves, as well as the dynamics of metabolism reflected in the breathed air *RI* (*Ra*) marked by the node leaves 3, who were in complete darkness for 78 hours. The analysis showed that gas exchange rates were higher in leaves between 30 and 180 emergency days (nodes 2 to 5) The leaves of the nodes 1 (0-30 days old) and 6 (150-180 days old) showed the lowest rates of gas exchange and the highest respiratory activity was the number two and three leaves nodes. The leaves of the nodes 6 showed a similar source behavior but weaker than the leaves of 2 and 3 nodes. With the methodology and determinations are not able to determine the functional limit between importer and exporter because was found ¹³CO₂ signature in all leaves tested. There was a clear relationship between gas exchange variables, environmental supply and the leaves age.

The second experiment evaluated the export and import of carbohydrates from leaves, stems and root of whole plants from eight months of age, materials CX2178 and BH1247 in response to conditions of differential temperature (*T*°C) (15°C, 25°C and 35°C) in phytotron, at 1.5, 24 and 48 hours after signature. There was a clear Source-Sink behavior among the organs tested. It was found that 25°C is the temperature for a better efficiency in physiological processes, as previously described. The balance between *F* and *R* (*Fn*) as 4598.1 μmoles(CO₂)m⁻²day⁻¹ while for the other two temperatures was negative showing the impact on *Coffea* sp. for *T*°C inadequate conditions. Metabolism at 15°C was lower, showing that the movement of compounds between organs, mainly starch and total sugars was lower, at 35°C enzyme required high rates were faster metabolism, causing also a physiological alteration by high

energy consumption, reflected in the high respiration rates and the movement of the compounds evaluated. In general, proteins and cellulose showed lower *RI* values, followed by lipids. When there were differences between genotypes were in favor of the *CX2178* material, which is related to its higher dry matter accumulation and production throughout its life cycle.

In the third experiment at field conditions was evaluated in *CU1970* and *BH1409* materials, the movement of assimilates from leaves and fruit in three development stages: first stage (from 0 to 8 weeks after flowering), second stage (weeks 9 to 17) and third stage (weeks 18 to 26), at 1.5, 48 and 72 hours after signature. The fruits of higher development (*F3*) showed the highest percentage amounts of starches, proteins and cellulose, followed by second states (*F2*) and third states fruits (*F1*) respectively. Sugars were present in equal amounts in all three fruit types, and were higher for glucose and fructose to sucrose, and show the importance of these compounds in source and sink relations of carbohydrates. As in previous experiments, there was a clear export behavior (leaves) and import of assimilates (fruits). The increased detection of labeled compounds (*RI*) was observed in starch and total sugars for *F1*, *F2* and *F3*, what agrees with their metabolic needs and energy for growth and development. Found close relationship between the rates of *F* and *R* leaves, which were measured in the leaves of the nodes 1 to 5, and the *IR* in accordance with age of the fruits. For some variables there were differences in favor of *CU1970* material, which also is consistent with increased production and accumulation of dry matter of the material *BH1409*.

Keywords: *Coffea* sp.; Isotope Ratio ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$); Source-Sink Relationship; Carbohydrates; Carbon Use Efficiency (*CUE*); Productivity.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Abstract.....	XI
Lista de figuras.....	XVII
Lista de tablas.....	XXIII
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XXIV
1. Introducción.....	1
2. Revisión general de literatura.....	3
2.1 Metabolismo vegetal.....	3
2.1.1 Metabolismo primario y secundario.....	3
2.2 Fotosíntesis.....	4
2.2.1 Los cloroplastos.....	4
2.2.1.1 Conversión de la energía luminosa en energía química (<i>ATP</i>) y poder reductor (<i>NADPH</i>) o fase luminosa de la Fotosíntesis.....	5
2.2.1.2 Ciclo de Calvin o fase oscura de la fotosíntesis.....	5
2.2.1.2.1 Ribulosa 1,5 Bisfosfato Carboxilasa-Oxigenasa (<i>Rubisco</i>).....	6
2.2.2 Síntesis de almidón y sacarosa.....	7
2.2.2.1 Síntesis de almidón.....	7
2.2.2.2 Síntesis de sacarosa.....	10
2.2.2.2.1 Sacarosa Fosfato Sintasa (<i>SPS</i>).....	10
2.2.2.3 Regulación de la síntesis de almidón y sacarosa.....	11
2.3 Respiración.....	12
2.3.1 Respiración de Crecimiento y Mantenimiento en los vegetales.....	13
2.3.2 Fotorespiración.....	14
2.4 Dinámica de la movilización de asimilados.....	15
2.4.1 Desde el cloroplasto hacia los tubos cribosos del floema.....	16
2.4.2 Desde el floema hacia los órganos de demanda.....	16
2.4.3 Velocidad en el transporte de asimilados.....	18
2.5 Relación Fuente - Demanda.....	19
2.6 Fotosíntesis y Relación Fuente - Demanda.....	20
2.7 Relación Fuente - Demanda en café.....	21
2.8 Bibliografía general.....	24

3.	Isótopos estables.....	33
3.1	Isótopos estables en Eco-Fisiología.....	33
3.1.1	Que son los Isótopos.....	33
3.1.1.1	Discriminación isotópica del carbono.....	33
3.2	Bibliografía.....	36
4.	Objetivos.....	41
4.1	Objetivo general.....	41
4.2	Objetivos específicos.....	41
5.	Experimento 1.....	43
5.1	Objetivo específico.....	43
5.2	Revisión de literatura.....	43
5.2.1	Transición Demanda a Fuente en hojas.....	43
5.3	Materiales y métodos.....	45
5.3.1	Ubicación.....	45
5.3.2	Material vegetal.....	46
5.3.3	Metodología de marcación de las hojas con $^{13}\text{CO}_2$	46
5.3.3.1	Mezcla de gases.....	46
5.3.4	Desarrollo del experimento.....	47
5.3.4.1	Liofilización de las muestras	49
5.3.4.2	Relación Isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) del Material Orgánico (MO).....	49
5.3.5	Análisis de la información.....	49
5.4	Resultados.....	50
5.4.1	Área Foliar (cm^2), Peso Seco Foliar (mg) y Área Foliar Específica ($AFE - \text{cm}^2\text{g}^{-1}$) de los nudos 1 a 6.....	50
5.4.2	Comportamiento de la Temperatura ($T^\circ\text{C}$), Humedad Relativa ($HR\%$) y Radiación Fotosintéticamente Activa [$RFA - \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$], durante los días de medición.....	50
5.4.3	Relación Isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) de hojas en diferentes nudos, luego de la marcación de la hoja del nudo 3 y sin marcar.....	52
5.4.4	Relación Isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) asociada al Área Foliar Específica ($AFE - \text{cm}^2\text{g}^{-1}$) con el tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$	52
5.4.5	Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por las hojas marcadas y aire normal.....	54
5.5	Discusión.....	55
5.6	Conclusiones.....	57
5.7	Bibliografía.....	57
6.	Experimento 2.....	61
6.1	Objetivo específico.....	61
6.2	Revisión de literatura.....	61
6.2.1	Temperatura ($T^\circ\text{C}$).....	61
6.2.1.1	Efectos de altas y bajas temperaturas sobre el metabolismo vegetal.....	61
6.3	Materiales y métodos.....	63
6.3.1	Ubicación.....	63

6.3.2	Material vegetal.....	64
6.3.3	Desarrollo del experimento.....	64
6.3.4.1	Medición del intercambio gaseoso (<i>IG</i>).....	64
6.3.4.2	Total de material vegetal evaluado.....	65
6.3.4.3	Liofilización de las muestras.....	66
6.3.4.3.1	Relación isotópica (<i>RI</i>) del Material Orgánico (<i>MO</i>).....	67
6.3.4.3.2	Cuantificación y relación isotópica (<i>RI</i>) de los productos del metabolismo del carbono.....	67
6.3.4.3.2.1	Cuantificación de los azúcares y <i>RI</i>	68
6.3.4.3.2.2	Cuantificación de los lípidos y <i>RI</i>	69
6.3.4.3.2.3	Cuantificación del Almidón y <i>RI</i>	69
6.3.4.3.2.4	Cuantificación de Celulosa y <i>RI</i>	70
6.3.4.3.2.5	Cuantificación de proteínas y <i>RI</i>	70
6.3.5	Análisis de la información.....	70
6.4	Resultados.....	71
6.4.1	Comportamiento de la temperatura ($T^{\circ}C$), humedad relativa (<i>HR</i> - %) e intercambio gaseoso (Fotosíntesis - <i>F</i> y Respiración - <i>R</i>) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] en plantas completas.....	71
6.4.2	Diferencias entre $T^{\circ}C$ para Fotosíntesis y Respiración.....	72
6.4.3	Diferencias en la relación isotópica (<i>RI</i> - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) entre plantas Marcadas y Control.....	74
6.4.4	Relación isotópica (<i>RI</i> - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por las plantas completas.....	74
6.4.5	Diferencias en la relación isotópica (<i>RI</i> - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) entre metabolitos.....	76
6.4.6	Área foliar (m^2) y peso seco (g) del material vegetal.....	77
6.4.7	Cuantificación de los compuestos asociados con el metabolismo del carbono.....	78
6.4.7.1	Cuantificación de almidón.....	78
6.4.7.2	Cuantificación de los azúcares.....	78
6.4.7.3	Cuantificación de lípidos, proteínas y celulosa en hojas.....	80
6.4.8	Relación isotópica (<i>RI</i> - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en las hojas.....	81
6.4.8.1	Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas - Hojas.....	83
6.4.9	Relación isotópica (<i>RI</i> - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en el tallo.....	85
6.4.9.1	Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas - Tallo.....	86
6.4.10	Relación isotópica (<i>RI</i> - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en la raíz.....	87
6.4.10.1	Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas - Raíz.....	88
6.4.11	Análisis de correlación entre las variables relación isotópica (<i>RI</i> - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$), peso seco, área foliar, fotosíntesis (<i>F</i>) y Respiración (<i>R</i>).....	89
6.5	Discusión.....	90
6.5.1	Comportamiento de la temperatura y variables climáticas asociadas.....	90
6.5.2	Respuesta del intercambio gaseoso (<i>IG</i>) a las temperaturas evaluadas.....	91
6.5.3	Dinámica de la <i>RI</i> ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado.....	92

6.5.4	Cuantificación de los metabolitos analizados.....	93
6.5.5	Comportamiento de la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los diferentes metabolitos y órganos analizados.....	94
6.6	Conclusiones.....	95
6.7	Bibliografía.....	96
6.A	Anexos.....	101
7.	Experimento 3.....	123
7.1	Objetivo específico.....	123
7.2	Revisión de literatura.....	123
7.3	Materiales y métodos.....	125
7.3.1	Ubicación.....	126
7.3.2	Material vegetal.....	126
7.3.3	Metodología de marcación de las plantas con ${}^{13}\text{CO}_2$	126
7.3.3.1	Mezcla de gases.....	126
7.3.4	Desarrollo del experimento.....	126
7.3.4.1	Medición del intercambio gaseoso (IG).....	127
7.3.4.2	Total de material vegetal evaluado.....	127
7.3.4.3	Liofilización de las muestras.....	128
7.3.4.3.1	Relación isotópica (RI) y cuantificación de los metabolitos.....	129
7.3.5	Análisis de la información.....	129
7.4	Resultados.....	129
7.4.1	Comportamiento de la Temperatura ($T^\circ\text{C}$), Fotosíntesis (F) - Respiración (R) [$\mu\text{mol}(\text{CO}_2)\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] y Radiación Fotosintéticamente Activa [$RFA - \mu\text{mol}(\text{fotones})\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$].....	129
7.4.2	Cuantificación de los compuestos asociados con el metabolismo del carbono en los diferentes tipos de frutos.....	132
7.4.3	Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en las hojas.....	134
7.4.4	Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas.....	135
7.4.4.1	Análisis de superficies para plantas marcadas – HOJAS.....	136
7.4.5	Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el material orgánico de las ramas.....	138
7.4.6	Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en los frutos.....	139
7.4.6.1	Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas-FRUTOS...	142
7.5	Discusión.....	145
7.5.1	Comportamiento de la temperatura, variables climáticas asociadas, intercambio gaseoso (IG) y relación isotópica (RI).....	145
7.5.2	Cuantificación de los metabolitos analizados.....	146
7.5.3	Comportamiento de la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) y dinámica Fuente-Demanda en los metabolitos y órganos analizados.....	147
7.6	Conclusiones.....	150
7.7	Bibliografía.....	150
7.A.	Anexos.....	154
8.	Discusión general.....	179

Lista de figuras

Capítulo 2 - Revisión general de literatura

- Figura 2-1:** Fase luminosa de la fotosíntesis en la cual se observan los foto-sistemas *II* y *I* (Adaptado de Hopkins y Hüner, 2004).....**5**
- Figura 2-2:** Ciclo de Calvin donde se observan las fases de Carboxilación, Reducción y Regeneración en el proceso fotosintético (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002).....**6**
- Figura 2-3:** Síntesis de almidón y sacarosa (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002)..... **9**

Capítulo 5 - Experimento 1

- Figura 5-1:** Desarrollo del experimento 1: cilindros de $^{13}\text{CO}_2$ preparado, CO_2 puro y CO_2 certificado, reguladores de presión y válvulas de aguja (**A**), sistema de mezcla de $^{13}\text{CO}_2$ preparado y aire ambiental (**B**), disposición de mangueras provenientes de la cámara de mezcla hacia las plantas (**C** y **D**), disposición de las hojas en las bolsas y mangueras de entrada y salida del aire (**E**), medición de F [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] en hojas individuales de los nudos 1 al 6 (**F**), cámara y hojas para medición de relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado (**G**), medición de R [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] en hojas individuales de los nudos 1 al 6 (**H**), equipo para la medición de la concentración de CO_2 en ppm y modo absoluto (**I**) y metodología para la toma de muestras de la mezcla $^{13}\text{CO}_2$ preparado-aire ambiental (**J**).....**48**
- Figura 5-2:** Humedad Relativa ($HR\%$) y Temperatura del aire ($T^\circ\text{C}$) (**A**), y Radiación Fotosintéticamente Activa [$RFA - \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (**B**) en el ambiente del sitio de medición, durante 4 días consecutivos.....**50**
- Figura 5-3:** Fotosíntesis [$F - \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] en las hojas de los nudos 1 al 6, de plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, genotipo CX2178. Los números sobre las barras corresponden a los nudos.....**51**
- Figura 5-4:** Relación entre RI ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)/ AFE (cm^2g^{-1}) en el material orgánico (MO) del total de las hojas de los nudos 1 al 6, para plantas de *C. arabica* L. var. Castillo El Rosario® genotipo CX2178, marcadas y control, entre las 0 y 72 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$. Los números asociados a cada nudo corresponden al valor de RI de la hoja..... **54**

Figura 5-5: Descripción de la Relación Isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por las hojas marcadas del nudo 3 en plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo El Rosario® genotipo CX2178, y del aire ambiental, entre las 0 y 72 horas posteriores a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$55

Capítulo 6 - Experimento 2

Figura 6-1: Imágenes que ilustran el desarrollo del experimento 2: fitotrón (A), medición del área foliar (B), disposición de la planta en la bolsa (C), disposición del material vegetal en el fitotrón (D), ingreso de ${}^{13}\text{CO}_2$ o CO_2 puro a la cámara de plástico (E), sistema de medición de IG (F y R) en plantas completas (primer plano), al fondo plantas en total oscuridad (F), disposición del material vegetal posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$ durante el día (G), plantas en el fitotrón en la noche y medición de respiración en plantas completas (derecha) (H).....66

Figura 6-2: Metodología de procesamiento, extracción, cuantificación y determinación de la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$).....68

Figura 6-3: Humedad relativa (%) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (A) e intercambio gaseoso (F = Fotosíntesis, R = Respiración) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (B), a los 15°C , 25°C y 35°C , en plantas completas de *Coffea arabica* L. var. Castillo® El Rosario, genotipos CX2178 y BH1247, durante cuatro días continuos. Las líneas punteadas en A muestran la temperatura del tratamiento.....72

Figura 6-4: Integración del área bajo la curva promedio diaria de fotosíntesis (F) y respiración (R) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] en plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, a los 15°C , 25°C y 35°C , para plantas marcadas y control, por genotipo (BH1247 y CX2178). Las barras indican el error estándar del promedio. $n=3$ días completos de medición.....73

Figura 6-5: Valores promedio de F (A) y R (B) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] y su variabilidad, en plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre temperaturas (Duncan 0.05).....73

Figura 6-6: Diferencias en la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) entre tratamientos. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=629$ para marcadas, $n=622$ para control.....74

Figura 6-7: Comportamiento de la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo El Rosario® genotipos BH1247 y CX2178, con relación al tiempo, entre 0 y 66 horas posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, para temperaturas del aire de 15°C , 25°C y 35°C , en plantas marcadas y control.....75

Figura 6-8: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por plantas completas de *Coffea arabica* L. var. Castillo® El Rosario y su interacción con la $T^{\circ}\text{C}$ y tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, en los genotipos BH1247 y CX2178.....76

Figura 6-9: Diferencias en la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) entre metabolitos. Los símbolos muestran el valor promedio y las barras verticales el error estándar. $n=103$ para cada metabolito.....77

- Figura 6-10:** Contenido de almidón ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$) en hojas, tallos y raíces, para plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario genotipos BH1247 y CX2178, marcadas y control, a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a los 15°C, 25°C y 35°C. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas al interior de los grupos (Duncan 0.05)..... **78**
- Figura 6-11:** Contenido de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa; $\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$) en hojas, tallos y raíces de plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, marcadas y control, los genotipos BH1247 y CX2178, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a los 15°C, 25°C y 35°C. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas al interior de los grupos (Duncan 0.05)..... **79**
- Figura 6-12:** Contenido de sacarosa (**A**), glucosa (**B**) y fructosa (**C**) ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$) en hojas, tallos y raíces de plantas de *C. arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, para plantas marcadas y control, los genotipos BH1247 y CX2178, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a los 15°C, 25°C y 35°C. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas al interior de los grupos (Duncan 0.05)..... **79**
- Figura 6-13:** Cuantificación de los Lípidos (%) [ácidos palmítico (**A**), linoléico (**B**), linolénico (**C**) y esteárico (**D**)] en las hojas de plantas de *C. arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, plantas marcadas y control, los genotipos BH1247 y CX2178, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a 15°C, 25°C y 35°C. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas al interior de los grupos (Duncan 0.05)..... **80**
- Figura 6-14:** Contenido de proteínas ($\text{mg g}^{-1} \text{ PS}$) en hojas de plantas marcadas y control, los genotipos BH1247 y CX2178, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a los 15°C, 25°C y 35°C. Promedios con letras iguales no denotan diferencias estadísticas entre grupos (Duncan 0.05)..... **81**
- Figura 6-15:** Contenido de celulosa ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$) en hojas, para plantas marcadas y control, los genotipos BH1247 y CX2178, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a los 15°C, 25°C y 35°C. Promedios con letras iguales no denotan diferencias estadísticas entre grupos (Duncan 0.05)..... **81**
- Figura 6-16:** Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en las hojas: material orgánico (**a**), almidón (**b**), azúcares totales (**c**), lípidos (**d**), proteínas (**e**) y celulosa (**f**), a los 15°C, 25°C y 35°C, las 0, 24 y 48 horas después de la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, genotipos BH1247 y CX2178, plantas marcadas y control. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada temperatura, genotipo, tiempo y tratamiento..... **83**
- Figura 6-17:** Modelos espaciales que describen la RI ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en respuesta a la interacción entre $T^\circ\text{C}$ y tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ en hojas de plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo El Rosario®. Material orgánico (**A**), almidón (**B**), azúcares totales (**C**), lípidos (**D**), proteínas totales (**E**) y celulosa (**F**)..... **84**
- Figura 6-18:** Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en el tallo: material orgánico (**a**), almidón (**b**) y azúcares totales (**c**), a los 15°C, 25°C y 35°C, las 0, 24 y 48 horas después de la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, genotipos BH1247 y CX2178, plantas marcadas y control. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada temperatura, genotipo, tiempo y tratamiento..... **86**

- Figura 6-19:** Modelos espaciales que describen la RI ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en respuesta a la interacción entre $T^\circ\text{C}$ y tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ en plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo El Rosario®. Material orgánico (**A**), almidón (**B**), azúcares totales (**C**)..... 87
- Figura 6-20:** Relación isotópica (RI - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en la raíz: material orgánico (**a**), almidón (**b**) y azúcares totales (**c**), a los 15°C , 25°C y 35°C , las 0, 24 y 48 horas después de la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, genotipos BH1247 y CX2178, plantas marcadas y control. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada temperatura, genotipo, tiempo y tratamiento.....88
- Figura 6-21:** Modelos espaciales que describen la RI ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en respuesta a la interacción entre $T^\circ\text{C}$ y tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ en plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo El Rosario®. Material orgánico (**A**), almidón (**B**), azúcares totales (**C**)..... 89
- Figura 6-22:** Análisis de correlación dos a dos por momento-producto de Pearson, entre las variables RI , peso seco, área foliar, fotosíntesis y respiración, y su relación con el tamaño y actividad, tanto de la fuente como de la demanda..... 90

Capítulo 7 - Experimento 3

- Figura 7-1:** Imágenes que ilustran el desarrollo del experimento 3: anillamiento en la base de la rama para evitar el movimiento de asimilados fuera de ella (**A**); calibración del medidor de flujo para el paso del aire proveniente del cilindro de $^{13}\text{CO}_2$ (**B**); disposición de la bolsa en la rama (**C**); ingreso del aire proveniente del cilindro de $^{13}\text{CO}_2$ (**D**); aplicación de CO_2 puro con jeringa a la bolsa con las ramas control (**E**); bolsa y rama enriquecidas con $^{13}\text{CO}_2$ o CO_2 puro (se observa la bolsa totalmente inflada) (**F**); recolección del material vegetal (rama, hojas y frutos tipo 1, 2 y 3, para posterior almacenamiento en nitrógeno líquido) (**G**); medición del IG (fotosíntesis y respiración - día y noche) en hojas individuales de los nudos 1 al 5 (**H**)..... 128
- Figura 7-2:** Fotosíntesis (F) - Respiración (R) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] y Temperatura ($T^\circ\text{C}$) (**A**). Radiación Fotosintéticamente Activa [RFA - $\mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (**B**), en plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo®, genotipos BH1409 y CU1970, marcadas y control, durante tres días continuos de medición en el campo.....130
- Figura 7-3:** Integración promedio diaria de Fotosíntesis (F) y Respiración (R) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] bajo condiciones de campo, en las hojas de los nudos 1 al 5, en *Coffea arabica* L. cv. Castillo®, plantas marcadas y control, genotipos BH1409 y CU1970. $n=3$ días completos de medición.....130
- Figura 7-4:** Diferencias en Fotosíntesis (F) (**A**) y Respiración (R) (**B**) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] entre los genotipos de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® BH1409 y CU1970.....131
- Figura 7-5:** Diferencias en la relación isotópica (RI - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) entre tratamientos (**A**), entre metabolitos (**B**), entre genotipos (**C**), y en el peso seco (g) entre tipos de frutos (**D**). Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar..... 131

- Figura 7-6:** Contenido de almidón ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$), azúcares totales ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$), proteínas totales ($\text{mg g}^{-1} \text{ PS}$) y celulosa ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$), en los diferentes tipos de frutos (*F1*, *F2* y *F3*) para plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® en el campo. Promedios con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tipos de frutos. $n=3$ para cada metabolito y tipo de fruto..... **133**
- Figura 7-7:** Contenido promedio de sacarosa, glucosa y fructosa ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$) en los diferentes tipos de frutos (*F1*, *F2* y *F3*) para plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® en el campo. Promedios con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tipos de frutos. $n=3$ para cada metabolito y tipo de fruto..... **133**
- Figura 7-8:** Contenido promedio de ácidos palmítico, linoléico, linolénico y esteárico (%) en los diferentes tipos de frutos (*F1*, *F2* y *F3*) para plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® en el campo. Promedios con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tipos de frutos. $n=3$ para cada metabolito y tipo de fruto..... **134**
- Figura 7-9:** Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en las hojas de plantas marcadas y control: material orgánico (**a**), almidón (**b**), azúcares totales (**c**), lípidos (**d**), proteínas (**e**) y celulosa (**f**), a las 0, 48 y 72 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, genotipos *BH1409* y *CU1970*. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada genotipo, tiempo y tratamiento..... **135**
- Figura 7-10:** Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en el material orgánico (**A**), almidón (**B**) y azúcares totales (**C**) en hojas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, fotosíntesis (*F*) y respiración (*R*)..... **137**
- Figura 7-11:** Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en los lípidos (**D**), proteínas (**E**) y celulosa (**F**) en hojas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, fotosíntesis (*F*) y respiración (*R*)..... **138**
- Figura 7-12:** Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en la *MO* de las ramas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ y respiración (*R*)..... **139**
- Figura 7-13:** Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en el material orgánico de los frutos totales, para los tratamientos marcadas y control, a las 0, 48 y 72 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, en los genotipos *BH1409* y *CU1970*. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada genotipo, tiempo y tratamiento..... **139**
- Figura 7-14:** Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en los diferentes tipos de frutos (*F1*, *F2* y *F3*) de plantas marcadas y control para: material orgánico (**a**), almidón (**b**) y azúcares totales (**c**), a las 0, 48 y 72 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, en los genotipos *BH1409* y *CU1970* de *Coffea arabica* L. var. Castillo®. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada genotipo, tiempo y tratamiento..... **141**
- Figura 7-15:** Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en los diferentes tipos de frutos (*F1*, *F2* y *F3*) de plantas marcadas y control para: lípidos (**d**), proteínas totales (**e**) y celulosa (**f**), a las 0, 48 y 72 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, en los genotipos *BH1409* y *CU1970* de *Coffea arabica* L. var. Castillo®. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada genotipo, tiempo y tratamiento..... **142**

Figura 7-16: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el material orgánico de los genotipos *BH1409* y *CU1970* (**A**), almidón (**B**) y azúcares totales (**C**) en frutos de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$ y peso seco..... **143**

Figura 7-17: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los lípidos (**D**) y las proteínas (**E**) en los genotipos *BH1409* y *CU1970*, y la celulosa (**F**) en frutos de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$ y peso seco..... **144**

Lista de tablas

Experimento 1

- Tabla 5-1:** Áreas bajo la curva de CO₂ preparado (¹³CO₂) y gases de referencia leídos en el Sistema Cromatógrafo de gases/Espectrómetro de masas (CG/EM)..... **46**
- Tabla 5-2:** Área foliar nudo⁻¹ (cm²); peso seco de hojas nudo⁻¹ (mg) y área foliar específica nudo⁻¹ (AFE - cm²g⁻¹), en hojas de *Coffea arabica* L. var. Castillo El Rosario[®] genotipo CX2178, de acuerdo con su posición en el nudo..... **50**
- Tabla 5-3:** Valores diarios de integración bajo la curva, para los 4 días consecutivos de medición, de las variables ambientales RFA [mol_(fotones)m⁻²día⁻¹], Temperatura (°C día⁻¹) y Humedad Relativa (unidades porcentuales día⁻¹)..... **51**
- Tabla 5-4:** Fotosíntesis y Respiración [μ mol_(CO2)m⁻²día⁻¹] en las hojas de los nudos 1 al 6, los cuatro días de medición, y la sumatoria de días y nudos en *C. arabica* L. var Castillo[®] El Rosario, genotipo CX2178..... **52**
- Tabla 5-5:** RI de muestras de hojas presentes en los nudos 1 al 6 entre las 0 y 72 horas luego de marcar las hojas del nudo 3 y de hojas sin marcar en *C. arabica* L. var Castillo[®] El Rosario, genotipo CX2178..... **53**
- Tabla 5-6:** RI del total de área foliar presente por nudo asociada al AFE, entre las 0 y 72 horas luego de marcar las hojas del nudo 3 y de hojas sin marcar en *C. arabica* L. var Castillo[®] El Rosario, genotipo CX2178..... **53**

Listado de símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
<i>A-Coa</i>	Acetil coenzima A
<i>ADPG</i>	Adenosin difosfato de glucosa
<i>ADPGPasa</i>	Adenosin difosfato de glucosa pirofosforilasa
<i>AFE</i>	Área foliar específica
<i>RNA_m</i>	Ácido ribonucleico mensajero
<i>ATP</i>	Adenosin trifosfato
<i>AS</i>	Almidón sintasa
<i>ASB</i>	Albúmina Sérica Bovina
<i>C₃</i>	Metabolismo fotosintético <i>C₃</i>
<i>C₄</i>	Metabolismo fotosintético <i>C₄</i>
<i>CG/EM</i>	Cromatógrafo de gases/Espectrómetro de masas
<i>CI - $\delta^{13}C$</i>	Composición isotópica del carbono
<i>C_i</i>	Concentración interna de CO ₂
<i>cm³</i>	Centímetros cúbicos
<i>CO₂</i>	Dióxido de Carbono
<i>DHAP</i>	Dihidroxiacetona fosfato
<i>DMSO</i>	Dimetil sulfóxido
<i>DPV</i>	Déficit de presión de vapor de agua
<i>EDTA</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>EUA</i>	Eficiencia en el uso del agua
<i>EUC</i>	Eficiencia en el uso del carbono
<i>F</i>	Fotosíntesis
<i>F_a</i>	Fotosíntesis acumulada
<i>F_n</i>	Fotosíntesis neta
<i>FI</i>	Fotosistema <i>I</i>
<i>FII</i>	Fotosistema <i>II</i>
<i>F6P</i>	Fructosa 6 fosfato
<i>FBP</i>	Fructosa 1,6 bisfosfato
<i>FBPasa</i>	Fructosa 2,6 bisfosfatasa
<i>g_s</i>	Conductancia estomática
<i>GA3P</i>	Gliceraldehído 3 fosfato
<i>G1P</i>	Glucosa 1 fosfato
<i>G6P</i>	Glucosa 6 fosfato
<i>GPT</i>	Glucosa-6-P/phosphate translocator
<i>G</i>	Gravedades
<i>HCl</i>	Ácido clorhídrico
<i>HPI</i>	Hexosa fosfato isomerasa
<i>HR</i>	Humedad relativa

Símbolo	Término
<i>IAF</i> _{acum.}	Índice de área foliar acumulado
<i>IC</i>	Índice de Cosecha
<i>IRGA</i>	Infrared gas analyser
<i>IG</i>	Intercambio Gaseoso
<i>IRMS</i>	Isotopic Relation Mass Spectrometer
<i>L</i>	Litro
<i>M</i>	Molar
<i>MAC</i>	Metabolismo ácido de las Crasuláceas
<i>mb</i>	Milibares
<i>M:C:A</i>	Metanol:Cloroformo:Agua
<i>mg</i>	Miligramos
<i>MgCl₂</i>	Cloruro de magnesio
<i>min</i>	Minutos
<i>ml</i>	Militros
<i>mM</i>	Milimolar
<i>MO</i>	Material orgánico
<i>N₂</i>	Nitrógeno
<i>NADPH</i>	Nicotinamin adenin dinucleótido fosfato reducido
<i>NH₃</i>	Amoníaco
<i>(NH₄)₂SO₄</i>	Sulfato de amonio
<i>O₂</i>	Oxígeno
<i>PDH</i>	Piruvato dehidrogenasa
<i>PEPC</i>	Fosfoenol piruvato carboxilasa
<i>PFE</i>	Peso foliar específico
<i>3-PGA</i>	3-fosfoglicerato
<i>PGK</i>	Fosfoglicerato quinasa
<i>pH</i>	Potencial de Hidrógeno
<i>Pi</i>	Fosfato inorgánico
<i>ppm</i>	Partes por millón
<i>PS</i>	Peso seco
<i>PSI</i>	Libra-fuerza por pulgada cuadrada
<i>PVP</i>	Polivinil pirrolidona
<i>PVPP</i>	Polivinil poli-pirrolidona
<i>R</i>	Respiración
<i>Ra</i>	Aire respirado
<i>R_a</i>	Respiración acumulada
<i>RFA</i>	Radiación fotosintéticamente activa
<i>RI</i>	Relación isotópica ¹³ CO ₂ / ¹² CO ₂
<i>RI/AFE</i>	Relación entre relación isotópica y Área foliar específica
<i>Rubisco</i>	Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa
<i>RuBP</i>	Ribulosa 1,5 bisfosfato
<i>SAS</i>	Statistical Analysis System
<i>SP</i>	Sacarosa fosfato
<i>SPS</i>	Sacarosa fosfato sintasa
<i>SPP</i>	Sacarosa Fosfato Fosfatasa
<i>SS</i>	Sacarosa sintasa
<i>SST</i>	Sólidos solubles totales
<i>T°C</i>	Temperatura
<i>TAN</i>	Tasa de asimilación neta
<i>TCA</i>	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
<i>TFB</i>	Trifluoruro de boro
<i>TP</i>	Triosas fosfato

Símbolo**Término***TPT*

Triosa fosfato transporter

UDPG

Uridin difosfato de glucosa

UDPGPasa

Uridin difosfato de glucosa pirofosforilasa

UMAS

Unidades de masa atómica

UTP

Uridin Trifosfato

 $\Delta^{13}C$

Discriminación isotópica del carbono

 ^{11}C

Isótopo radiactivo 11 del carbono

 ^{12}C

Isótopo estable 12 del carbono

 $^{12}CO_2$

Isótopo estable 12 del dióxido de carbono

 ^{13}C

Isótopo estable 13 del carbono

 $^{13}CO_2$

Isótopo estable 13 del dióxido de carbono

 ^{14}C

Isótopo radiactivo 14 del carbono

 μg

Microgramos

 μL

Microlitros

1. Introducción

El objetivo fundamental de los sistemas de producción vegetal es lograr la mayor acumulación de biomasa en el órgano que se cosecha, lo cual se debe traducir en un mayor retorno de la inversión efectuada. Lo anterior se logra en la medida que los factores de la producción se conjuguen permitiendo la máxima eficiencia, de tal forma que los ingresos de insumos se conviertan en las máximas salidas a través del producto económicamente importante, en consonancia con el medio ambiente. La relación que mide la eficiencia del sistema, a través del cociente entre el peso de la biomasa en el órgano cosechado y la biomasa total producida, se conoce como Índice de Cosecha (*IC*). Una estrategia biológica o agronómica que permita mejorar este índice ha sido el propósito fundamental de la investigación agrícola durante el último siglo. Grandes avances se han llevado a cabo en cultivos anuales, a través del mejoramiento de la interceptación de la luz y del direccionamiento de los asimilados hacia los órganos recolectados, sin embargo, en plantas perennes, solo recientemente este tema es abordado desde la perspectiva fisiológica, bioquímica y molecular. En general, los estudios de la relación Fuente-Demanda, o de priorización de la distribución de asimilados, indican que la producción de altas cantidades de éstos a través de una mayor eficiencia fotosintética no son garantía para la obtención de mayor acumulación en los órganos de interés económico, pues esto dependerá de los requerimientos energéticos y del estado de desarrollo del vegetal, lo cual se encuentra regulado genética y ambientalmente.

La variabilidad y el cambio climático global son una realidad. El comportamiento y la respuesta de las diferentes especies cultivadas a estos cambios, especialmente en las zonas tropicales, ha despertado la preocupación y el interés del sector agrícola en general. Los regímenes cambiantes de temperatura, componente de suma importancia en el crecimiento y desarrollo de las plantas, ha causado un desbalance negativo en los cultivos, de tal manera que ha afectado el *IC* con profundas consecuencias económicas y de seguridad alimentaria. Este desbalance está regulado fundamentalmente por el cambio en la dinámica de fuente y demanda de asimilados, que hace que los principales compuestos del metabolismo bioquímico, como almidones, azúcares, proteínas, lípidos y celulosa, respondan de una manera diferencial a la oferta ambiental, de acuerdo con su estado de desarrollo.

El café, *Coffea arabica* L., es un cultivo de importancia económica al nivel mundial; setenta países lo producen. Debido a diversas condiciones climáticas, causadas básicamente por el fenómeno de la niña, y a otros factores que afectaron la producción en los últimos cuatro años, Colombia pasó de ser el segundo productor mundial, a ser el cuarto, detrás de Brasil, Vietnam e Indonesia. El cultivo se encuentra plantado en

900.000 hectáreas y de él derivan su sustento 550.000 mil familias, lo cual refleja su importancia social, económica y ambiental. A pesar de las estadísticas de baja producción, se prevé un aumento en la misma en los próximos años, pues los programas de renovación con variedades más productivas y resistentes a enfermedades, así como programas de fertilización y la finalización del fenómeno de la niña, contribuirán con el aumento de la producción nacional. Igualmente, entre los años 2010 y 2020, se prevé un incremento mundial en el consumo de cafés suaves como el colombiano, de 5.7 millones de sacos de 60 kilos, lo que significa una tasa de crecimiento anual del 1.3% (Muñoz, 2010)*.

Para recuperar la participación del café colombiano en el mundo, entre muchos aspectos a mejorar, está la productividad del cultivo, la cual se mide fundamentalmente por el *IC*. Para ello se hace necesario profundizar en el conocimiento de los principales procesos fisiológicos que afectan la productividad de las plantas, entre los cuales están la fotosíntesis (*F*), la respiración (*R*) y la distribución de los asimilados. Una respuesta positiva del sistema planta a estos procesos está dada por su genética, por la oferta ambiental y por su interacción, factores que determinan el éxito o fracaso económico de cualquier cultivo.

En general en el mundo se ha desarrollado bastante el conocimiento sobre los procesos de intercambio gaseoso, pero se desconocen aspectos fundamentales del metabolismo y cómo los carbohidratos sintetizados se distribuyen entre los diferentes órganos, especialmente en especies perennes y semi-perennes. Por sus características de cultivos de mediano y largo plazo, la interacción y superposición de eventos fenológicos y fisiológicos, hacen que la comprensión de la dinámica en la exportación e importación de compuestos carbonados sea compleja.

En Colombia se ha avanzado al entender la fisiología del cultivo del cafeto en aspectos básicos como la *F* y en menor medida la *R*. Sin embargo dichos estudios han sido puntuales y su aplicación práctica en el campo no es amplia, de tal manera que deben ser complementados con investigaciones, como la que aquí se presenta, para entender con mayor profundidad el proceso productivo y así avanzar hacia la obtención de variedades y prácticas agronómicas que permitan mejorar el *IC*, lo que redundaría en el mejoramiento de la calidad de vida de los caficultores colombianos.

Si bien los isótopos estables del carbono han sido utilizados desde tiempo atrás en estudios geológicos y biológicos, en la actualidad la metodología de marcación con Carbono 13 (isótopo estable no radiactivo) permite evaluar la eficiencia en el uso de éste elemento (*EUC*) y se está empleando en estudios de fisiología y eco-fisiología, con el fin de generar tecnologías para el manejo de las plantaciones que redunden en un mayor beneficio biológico, productivo y económico para el productor, y el mejor desempeño y sostenibilidad de los agro-ecosistemas. Como herramienta útil, fue utilizada en el presente trabajo con el objetivo de profundizar en la comprensión básica del proceso Fuente-Demanda en *Coffea* sp.

Muñoz, L. 2010. Perspectivas de la caficultura colombiana. III Conferencia mundial del café. Febrero 27 de 2010. Ciudad de Guatemala.

2. Revisión general de literatura

2.1 Metabolismo vegetal

Se entiende por metabolismo al conjunto de reacciones físicas y químicas que ocurren en las células, sean animales o vegetales; este proceso es la base de la vida y permite la ocurrencia de actividades celulares complejas como crecer, dividirse, mantener sus estructuras, especializarse y responder al ambiente. El metabolismo en general se divide en dos sucesos altamente relacionados: catabolismo y anabolismo. En el catabolismo hay liberación de energía, producida por la utilización y degradación de compuestos previamente formados; las reacciones anabólicas usan esta energía para la recomposición y construcción de enlaces químicos y posterior acumulación de componentes celulares como carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos entre otros. Tanto el catabolismo como el anabolismo son procesos acoplados, que por su interdependencia, hacen del metabolismo un solo proceso (Taiz y Zeiger, 2002).

Así, el balance de la actividad celular en un organismo se produce a través de rutas metabólicas, en las cuales un compuesto químico que participa como sustrato, es transformado en otro compuesto o producto, y este a su vez puede ser sustrato para generar uno nuevo, siguiendo una secuencia de reacciones físico-químicas mediadas por un grupo enzimático particular, que se comporta como factor regulador de las vías metabólicas, modificando su actividad y funcionalidad, en respuesta al ambiente y a las necesidades de la célula y de la planta en general (Piñol y Palazón, 1993; Taiz y Zeiger, 2002).

El proceso a través del cual se generan azúcares y carbohidratos para el crecimiento y desarrollo de las plantas es la fotosíntesis, donde a partir de moléculas simples se reducen moléculas más complejas. Por su parte, la respiración utiliza parte de los carbohidratos formados en el proceso fotosintético como sustrato para la oxidación a moléculas más simples, evidenciando que las reacciones que suceden en la respiración son contrarias a las de la fotosíntesis; tales procesos son el pilar fundamental del metabolismo, crecimiento y desarrollo vegetal (Azcon-Bieto y Talon, 1993).

2.1.1 Metabolismo primario y secundario

Las plantas poseen rutas metabólicas en las que sintetizan y utilizan compuestos orgánicos como almidón, azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y polímeros (polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc.). Estas rutas y los

metabolitos formados, esenciales para la supervivencia de los vegetales, constituyen el metabolismo primario (Taiz y Zeiger, 2002).

Además, los vegetales debido a la presión evolutiva y adaptativa, se han especializado en la elaboración de metabolitos que se producen en el denominado metabolismo secundario y se asocian con grupos taxonómicos al nivel de género, familia, etc. Su síntesis suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a relaciones bióticas y abióticas con el medio circundante (Piñol y Palazón, 1993). Un adecuado equilibrio metabólico en las plantas derivado de la expresión del genotipo, su respuesta al ambiente predominante y la combinación de ambos permite la síntesis y acumulación de compuestos de carbono que aseguran su supervivencia (Roeb *et al.*, 2009). Así, los carbohidratos son la principal fuente de energía para la reducción de otros materiales orgánicos y están directamente involucrados en el crecimiento y diferenciación celular (Nagele *et al.*, 2010).

La acumulación de carbohidratos en los diferentes órganos está determinada por la actividad fotosintética y la demanda de energía e intermediarios para su expansión y diferenciación. El incremento en biomasa, por tanto, es el resultado de los excedentes de asimilados no utilizados en los procesos de mantenimiento y transporte (Aranjuelo *et al.*, 2009).

Una de las mayores dificultades en el estudio del metabolismo del carbono (Fotosíntesis, Respiración, “Allocation” o Asignación, “Distribution” o Transporte-Exportación y “Partitioning” o Distribución-Repartición) es medir los diferentes procesos simultáneamente en un mismo experimento (Amthor, 2000).

2.2 Fotosíntesis

Es el proceso mediante el cual las plantas utilizan la energía solar como medio para oxidar el agua, liberar oxígeno y fijar CO₂, que permite la formación de azúcares y otros compuestos carbonados, que hacen parte del metabolismo primario y secundario. Este proceso responde en un 95% por la producción de biomasa vegetal (Devlin, 1970), la cual se distribuye en órganos de captación y transformación de energía (hojas), de soporte (tallos, ramas y raíces), así como en los órganos de interés económico (frutos y semillas principalmente) (DaMatta y Rodríguez, 2005); dicho proceso se lleva a cabo en el cloroplasto, dando origen a productos fundamentales como el almidón, que inicialmente se almacena en el interior del organelo, y la sacarosa que se transporta a los sitios de utilización como fuente energética primaria para garantizar el crecimiento, mantenimiento y desarrollo de la planta (Woodrow y Berry, 1988).

2.2.1 Los cloroplastos

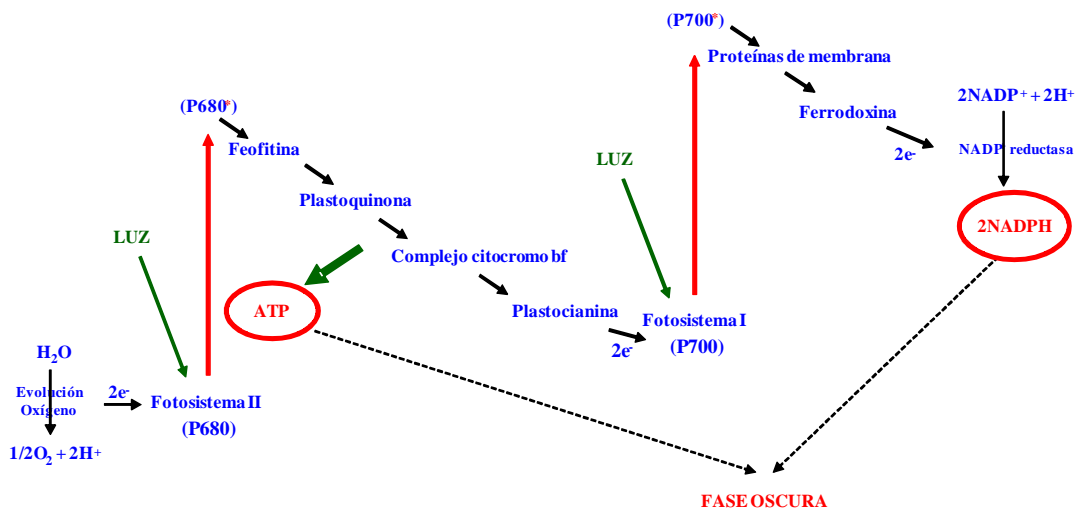
Son organelos con un elaborado arreglo de sacos membranosos o tilacoides, interconectados e inmersos en su estroma, con la capacidad de convertir la energía luminosa en energía química (*Adenosín Trifosfato* - ATP) y poder reductor (*Nicotinamín Adenín Dinucleótido Fosfato* - NADPH), así como catalizar los procesos físicos y químicos celulares, la fijación de CO₂ y la síntesis de metabolitos intermediarios en las reacciones oscuras, hacia la formación de compuestos esenciales

para la célula y el vegetal. Es allí donde ocurre el ciclo de Calvin (Bassham y Calvin, 1957) y así mismo, en ellos se encuentra la Ribulosa 1-5 Bisfosfato Carboxilasa Oxigenasa (*Rubisco*), principal enzima del proceso fotosintético (Kozlowski y Pallardy, 1997; Bowyer y Leegood, 1997).

2.2.1.1 Conversión de la energía luminosa en energía química (*ATP*) y poder reductor (*NADPH*) o fase luminosa de la fotosíntesis

Existen dos tipos de reacciones luminosas asociadas a iguales tipos de complejos fotosintéticos: los fotosistemas *II* y *I* (*FII* y *FI*). En el primero se transfieren los electrones provenientes de la fotólisis del agua a una quinona, con liberación simultánea de O_2 ; en el segundo se genera poder reductor en forma de *NADPH*; el flujo de electrones entre los dos fotosistemas genera protones para la síntesis de energía química en forma de *ATP*. Así mismo, la Radiación Fotosintéticamente Activa (*RFA*) regula la actividad de diversas enzimas fotosintéticas en los cloroplastos; dichas enzimas se activan durante el día y disminuyen su actividad en la oscuridad. Por lo tanto, la producción de carbohidratos a partir de CO_2 se interrumpe durante la noche a causa de la inactividad enzimática, además del cierre estomático y de una deficiencia en la producción de *ATP* y *NADPH* (Stryer, 1988; Taiz y Zeiger, 2002) (figura 2-1).

Figura 2-1: Fase luminosa de la fotosíntesis en la cual se observan los foto-sistemas *II* y *I* (Adaptado de Hopkins y Hüner, 2004).

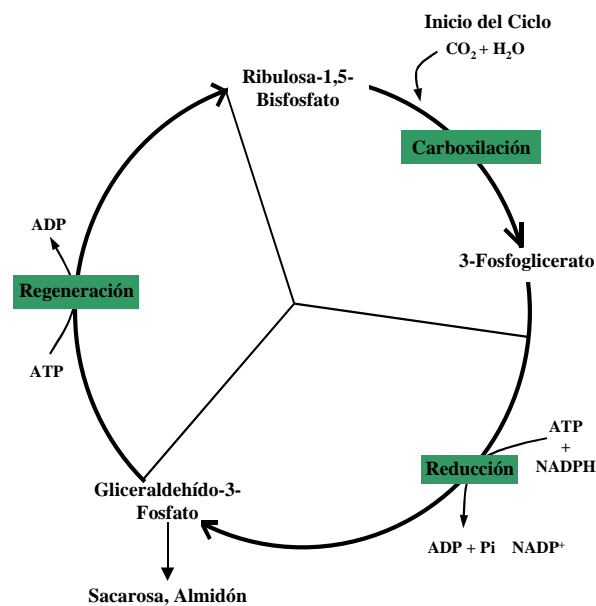


2.2.1.2 Ciclo de Calvin o fase oscura de la fotosíntesis

En las reacciones de fijación del carbono en el ciclo de Calvin, conocidas como fase bioquímica, se presentan tres pasos: carboxilación, reducción y regeneración (figura 2-2). En ellos, los productos de las reacciones luminosas se utilizan para sintetizar carbohidratos. Estas se llevan a cabo en el estroma de los cloroplastos y es necesaria la presencia de *ATP* y *NADPH*, formados por foto-fosforilación en la fase luminosa. El primero suministra la energía necesaria para la reducción del CO_2 a carbohidratos, mientras que el segundo es la molécula reductora (Azcon-Bieto y Talon, 1993;

Sengbusch, 2007). En la carboxilación, el aceptor primario Ribulosa 1,5 bisfosfato (*RuBP*) es carboxilado por *Rubisco*, formando dos moléculas de 3 fosfoglicerato (3-*PGA*), siendo este el primer producto estable formado en el ciclo. En la fase de reducción el 3-*PGA* es reducido a gliceraldehído 3 fosfato (*GA3P*), con la utilización de *ATP* y *NADPH*; el *GA3P* es uno de los componentes de las *TP*, fundamentales en el metabolismo vegetal. En la fase de regeneración, el *GA3P* es defosforilado para así formar nuevamente *RuBP* e iniciar nuevamente el ciclo. Estas reacciones implican la reorganización de los enlaces covalentes entre el carbono, el hidrógeno y el oxígeno, en las que intervienen enzimas que reducen el carbono por la transferencia de hidrógeno y reacomodan los compuestos de carbono, para sintetizar carbohidratos (Sengbusch, 2007).

Figura 2-2: Ciclo de Calvin donde se observan las fases de Carboxilación, Reducción y Regeneración en el proceso fotosintético (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002).



2.2.1.2.1 Ribulosa 1,5 Bisfosfato Carboxilasa-Oxigenasa (*Rubisco*)

La *Rubisco*, enzima fundamental en la producción de biomasa vegetal, cataliza el ingreso del CO_2 al metabolismo fotosintético y regula la formación de los productos intermediarios del proceso. Constituye entre el 20 y el 50% de la proteína total soluble del cloroplasto y modula la producción de los metabolitos iniciales para la fotosíntesis (3-*PGA*) y para el ciclo C_2 o fotorespiratorio (fosfoglicolato), como resultado de la competencia entre CO_2 y O_2 por el sitio activo. Esta enzima presenta diversas formas activas, pero es la forma carbamilada la que tiene implicaciones en la reducción del CO_2 a compuestos carbonados (Pierce, 1989).

De las diferentes enzimas relacionadas con la fijación de CO_2 , *Rubisco* es la única que conduce directamente a la conversión en carbohidratos; las otras carboxilasas, como la fosfoenol piruvato carboxilasa (*PEP-C*), forman ácidos orgánicos que se decarboxilan posteriormente para participar en la síntesis de carbohidratos, como es el caso de las especies C_4 (Woodrow y Berry, 1988; Pierce, 1989; Tolbert, 1997). Su papel en la

regulación de la fotosíntesis ha sido reportado por numerosos autores (Woodrow y Berry, 1988, Campbell y Ogren, 1990) y su actividad provee el aceptor primario de la fotosíntesis (*3-PGA*) necesario para hidrolizar el *ATP* y oxidar el *NADPH*. Además, puede regular o limitar la fotosíntesis, ya que la tasa a la cual suministra *3-PGA*, determina la tasa del transporte electrónico y así, la tasa máxima de fotosíntesis (Sharkey, 1989).

Los compuestos derivados del ciclo de Calvin, fundamentalmente almidón y sacarosa, son transferidos desde el cloroplasto a otros órganos de la planta, donde son utilizados para la síntesis de constituyentes esenciales de la célula, o utilizados para regenerar la energía en el proceso de respiración mitocondrial (Kelly *et al.*, 1976, Taiz y Zeiger, 2002).

2.2.2 Síntesis de almidón y sacarosa

El CO_2 tomado de la atmósfera y reducido al nivel de *TP* (*GA3P* y Dihidroxiacetona Fosfato - *DHAP*) son usados para producir carbohidratos, en especial almidón, sacarosa y hexosas (glucosa, fructosa y otros azúcares), los cuales son transportados desde los sitios de síntesis a los de utilización en el caso de la sacarosa, y para la formación de componentes de pared, o como fuente de energía y de intermediarios metabólicos primarios procedentes del ciclo respiratorio (Foyer y Galtier, 1996; Burrell, 2003; Geigenberger, 2003; Hopkins y Hüner, 2004).

2.2.2.1 Síntesis de almidón

El almidón es el principal carbohidrato de reserva en la mayoría de los vegetales. En las hojas se acumula en los cloroplastos como producto directo de la fotosíntesis; en los órganos de almacenamiento se acumula en los amiloplastos, en los que se forma después de la translocación de la sacarosa principalmente. Igualmente se encuentra en uno o más granos amiláceos de un plastidio, y su cantidad en los diversos tejidos depende de factores genéticos y ambientales, pero en las hojas el nivel y duración de la luz tienen especial importancia. Este se acumula en el día cuando la fotosíntesis supera las tasas combinadas de respiración y translocación; en la noche parte desaparece debido a ambos procesos (Jenner, 1982; Zhou y Quebedeaux, 2003; Burrell, 2003).

En la mayoría de las plantas perennes, arbustos y deciduos, se almacena preferentemente en amiloplastos de ramas jóvenes, en la corteza o células del parénquima floemático, en células vivas del parénquima xilemático, así como en algunas células del parénquima de almacenamiento en la raíz. Los tallos, la corteza y las células de la médula son puntos habituales de almacenamiento, tanto en especies anuales como perennes (Smith *et al.*, 2003).

Químicamente el almidón es la mezcla de dos polisacaridos muy similares: la amilosa y la amilopectina. Contienen regiones cristalinas y no cristalinas en capas alternas. Puesto que la cristalinidad es producida por el ordenamiento de las cadenas de amilopectina, los gránulos de almidón céreo tienen similar grado de cristalinidad que los almidones normales. La disposición radial y ordenada de las moléculas de almidón en un gránulo resulta evidente al observar la cruz de polarización (cruz blanca sobre un

fondo negro) en el microscopio cuando se colocan los polarizadores a 90° entre sí. El centro de la cruz corresponde al hilum, el centro de crecimiento del gránulo (Taiz y Zeiger, 2002; Smith *et al.*, 2003).

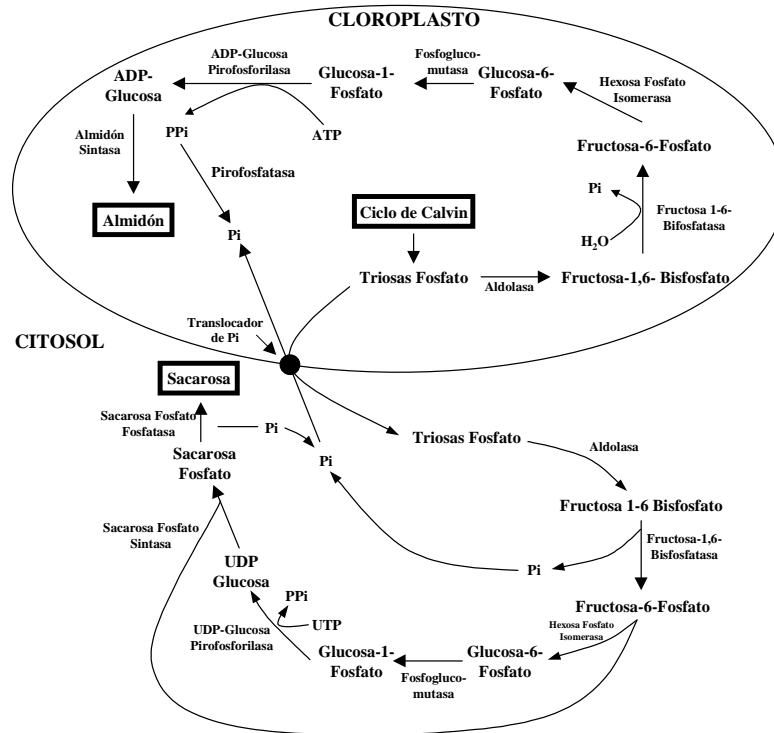
La amilosa es el producto de la condensación de *D*-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos α -(1,4), que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón de daltones. Así, la amilosa es una α -*D*-(1,4)-glucana cuya unidad repetitiva es la maltosa, con la propiedad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice contiene seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice alberga sólo átomos de hidrógeno, por tanto es lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados en el exterior de la hélice. La mayoría de los almidones contienen alrededor del 25% de amilosa (Taiz y Zeiger, 2002; Smith *et al.*, 2003).

La amilopectina se diferencia de la amilosa en que presenta ramificaciones que le dan una estructura molecular similar a la de un árbol. Las ramas están unidas al tallo central (semejante a la amilosa) por enlaces α -*D*-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa. Su peso molecular es muy alto ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta doscientos millones de daltones. La amilopectina constituye alrededor del 75% de los almidones más comunes (Taiz y Zeiger, 2002).

El almidón se forma a partir de Adenosin Difosfato de Glucosa (*ADPG*), la cual puede ser obtenida por *ATP* y Glucosa-1-Fosfato (*G1P*) en el cloroplasto y otros plastidios. Su síntesis sigue la ruta que se presenta en la figura 2-3: inicia con las *TP* del ciclo reductivo del carbono; por una reacción de aldolización se forma Fructosa-1-6 Bisfosfato (*FBP*); posteriormente por acción de la Fructosa-1-6 Bisfosfatasa (*FBP_{asa}*) junto con agua y liberación de fósforo inorgánico (*Pi*), forma Fructosa-6-Fosfato (*F6P*) y, por isomerización, se obtiene Glucosa-6-Fosfato (*G6P*). Luego, por una Fosfoglucomutasa sintetiza *G1P*, la cual es convertida a *ADPG* por la catálisis de una pirofosforilasa dependiente del *ATP*. Finalmente, a través de la Almidón Sintetasa (*AS*), la cual es activada mediante iones de K^+ , el carbono 1 de la *ADPG* es adherido al carbono 4 de una glucosa terminal, en una cadena de almidón en formación (Beck y Ziegler, 1989; Lu y Sharkey, 2006; Kaplan *et al.*, 2006). Su acumulación se presenta únicamente cuando la capacidad para la síntesis de sacarosa está saturada, lo cual ocurre en coordinación con la abundancia relativa de *Pi* y los precursores *TP* y *3-PGA*, entre los cloroplastos y el citosol (Foyer y Galtier, 1996; Lu y Sharkey, 2006; Kaplan *et al.*, 2006).

El almidón almacenado transitoriamente es degradado en la noche a maltosa y en menor grado a glucosa, productos que son exportados al citosol para conversión a sacarosa que es movilizada hacia el floema para participar en el proceso de respiración durante la noche (Braütigam y Weber, 2011).

Figura 2-3: Síntesis de almidón y sacarosa (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002).



La inhibición del metabolismo de la maltosa y su menor exportación sugiere una disminución de la tasa de degradación del almidón, lo que soporta la hipótesis que la maltosa es la forma predominante de carbono exportado desde los cloroplastos (Lu y Sharkey, 2006). Otro metabolito, la trehalosa, participa tanto en la síntesis como en la degradación del almidón y tiene fuerte influencia en el metabolismo, crecimiento y desarrollo vegetal; Ramon *et al.* (2007) en plantas de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. que crecieron en concentraciones de 25 mM de trehalosa sin sacarosa y en presencia de Validamycin A (potente inhibidor de la actividad trehalasa) indujo la expresión de *ApL3* que codifica la subunidad larga de *ADPGPasa* causando hiper-acumulación de almidón en los cotiledones (Hopkins and Hüner, 2004).

En arroz (*Oriza sativa* L.) el llenado del grano está afectado no sólo por el abastecimiento de carbohidratos desde los órganos fuente, sino también por la actividad del vertedero que incluye la actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis del almidón. Después de 16 días de cultivar espigas en condiciones de laboratorio, a concentraciones de 50-70 g de sacarosa L^{-1} , el llenado fue mayor, pero no lo fue a concentraciones superiores. Las actividades de *ADPGPasa*, almidón sintasa y sacarosa sintasa fue menor en granos que crecieron sin sacarosa, pero aumentó cuando éstas incrementaron, así como la expresión de ácido ribonucleico mensajero (*RNAm*) para éstas enzimas y para transportadores del metabolito (Sasaki *et al.*, 2005; Ainsworth y Bush, 2011).

Recientemente se han identificado enzimas que permiten la síntesis del almidón en el floema de plantas superiores, tales como *AtGWD2* (isoforma de una α -glucano dikinasa) (Lu y Sharkey, 2006). En *A. thaliana* L. Heynh. se encontraron gránulos de

almidón distribuidos en los plástidos de los tubos cribosos del floema de las raíces, cerca de las mitocondrias, por lo cual se cree pueden proveerlas de sustrato para su metabolismo (Wu y Zheng, 2003).

2.2.2.2 Síntesis de sacarosa

La sacarosa es un disacárido sintetizado en el citosol, compuesto por una unidad de glucosa y una de fructosa, unidas por los carbonos 1 y 2 respectivamente. Es un compuesto de especial importancia por su ubicuidad y abundancia en los vegetales, sirve como fuente de energía en las células fotosintéticas y se transloca con facilidad por el floema hacia los tejidos en desarrollo, regulando el desempeño de las relaciones Fuente-Demanda; su síntesis está asociada con la fosforilación de la glucosa y la fructosa, tal como se presenta en la figura 2-3 (Taiz y Zeiger, 2002).

En general, las *TP* previamente sintetizadas son exportadas desde los cloroplastos y convertidas por aldolización en *FBP*. Luego, a través de la *FBP* se convierte en *F6P* con liberación de *Pi*; la *F6P* se transforma en *G6P*, reacción catalizada por la Hexosa Fosfato Isomerasa (*HFI*), y posteriormente en *G1P* a través de una Fosfoglucomutasa. Esta a través de la Uridín Difosfato de Glucosa Pirofosforilasa específica (*UDPGPasa*) produce Uridín Difosfato de Glucosa (*UDPG*) con liberación de *Ppi*. Luego por la acción de la Sacarosa Fosfato Sintasa (*SPS*) la *UDPG* produce Sacarosa Fosfato (*SF*). La *F6P* previamente sintetizada puede formar *SF* directamente con la mediación de la enzima *SPS*. Por último, la *SF* forma sacarosa por la acción de Sacarosa Fosfato Fosfatasa (*SPP*) con liberación de *Pi* (Huber *et al.*, 1993; Sasaki *et al.*, 2005).

La concentración resultante de sacarosa en los tejidos es variable y puede regular otras funciones como diferenciación celular, actividad enzimática y acción hormonal. Así mismo, puede alcanzar niveles cercanos al 80% del peso seco en algunos tejidos de almacenamiento como sustancia de reserva (Edelman *et al.*, 1971; Glasziou y Gayler, 1972; Huber y Huber, 1992). En las hojas, cerca del 40% de la sacarosa es almacenada temporalmente en la vacuola antes de ser exportada, cerca del 5% es respirada y casi el 50% es exportada directamente hacia los órganos de demanda (Huber, 1996).

2.2.2.2.1 Sacarosa Fosfato Sintasa (*SPS*)

La *SPS* es la enzima que permite la síntesis de sacarosa; es soluble en el citoplasma y cataliza libremente reacciones reversibles; es activada por *G6P* e inhibida por *Pi*, los cuales se unen en el mismo sitio activo de la enzima. Esta es regulada en los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos, por metabolitos intermediarios y por la fosforilación de proteínas. En las hojas, la fosforilación modula la actividad de *SPS* en respuesta a las señales luminosas y no luminosas y a la acumulación de productos finales (Huber *et al.*, 1993; Sasaki *et al.*, 2005).

Su actividad está inversamente correlacionada con la acumulación de almidón en las hojas y directamente con la exportación de asimilados y el crecimiento de las plantas. Otras actividades enzimáticas en las hojas no muestran correlación con la tasa de exportación y el crecimiento vegetal. Así, cambios en su actividad podrían tener repercusiones sobre la fotosíntesis, exportación de compuestos de carbono desde las

hojas y, posiblemente, sobre el crecimiento y la acumulación de biomasa (Battistelli *et al.*, 1991; Foyer y Galtier, 1996; Sasaki *et al.*, 2005).

2.2.2.3 Regulación de la síntesis de almidón y sacarosa

Si la síntesis de sacarosa es superior a la exportación, hay mayor formación de almidón; así, la síntesis de sacarosa se altera por inhibición de *SPS*, lo que permite un incremento de hexosas fosfato y de *FBP* en el citosol, incrementando los niveles de *TP*, y obstruyendo su exportación desde el cloroplasto; como consecuencia, se retiene más carbono en el cloroplasto, que entra a la ruta de síntesis del almidón. La reducción de la síntesis de sacarosa adicionalmente evita el ciclaje de *Pi*, lo que genera la acumulación de 3-*PGA* en el cloroplasto; lo anterior es debido probablemente a que la fosfoglicerato quinasa (*PGK*) es particularmente sensible a una caída en la concentración de *ATP* que ocurre bajo estas condiciones, luego la relación 3*PGA*/*Pi* es elevada en el cloroplasto, y estimula la síntesis de almidón por activación alostérica de *ADPasa* (Dunford, 2002; Sasaki *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006).

Por el contrario, al inicio del día la fotosíntesis incrementa la producción de *DHAP* debido a una mayor tasa de exportación de *TP* desde el cloroplasto a cambio de *Pi*, por lo que la relación 3-*PGA*/*Pi* aumenta; estos cambios ocasionan un incremento en la concentración de *F6P*, sustrato de *FBP* en el citosol; con su incremento hay una rápida caída en la concentración de fructosa 1,6 bisfosfato, potente inhibidor de *FBP*; una consecuencia del incremento en *FBP* es un aumento en la concentración de *G6P* en el citosol; esto permite una mayor tasa en la relación *G6P*/*Pi* y causa una fuerte activación alostérica de una de las rutas de síntesis de la sacarosa, catalizada por *SPS*, que resulta en una mayor producción de este metabolito; además el elevado *Pi* en el plastidio, inhibe la reacción catalizada por *ADPasa*, restringiendo la síntesis de almidón. La regulación metabólica hacia la síntesis de almidón o de sacarosa tiene implicaciones fundamentales en las relaciones Fuente-Demanda en los vegetales (Sasaki *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006).

Se ha propuesto que la concentración de sacarosa en el apoplasto de las células guarda es una señal que inhibe la apertura de los estomas cuando la fotosíntesis y la transpiración son muy altas (Outlaw Jr y DeVlieghere-He, 2001; Kang *et al.*, 2007). Igualmente se ha encontrado que las invertasas (isoenzimas vacuolar, de pared celular y neutral) juegan un papel primordial en el metabolismo del carbono de las plantas, ya que producen la hidrólisis de la sacarosa y su exportación; éstas se diferencian en su localización subcelular, solubilidad y *pH* óptimo, siendo activa en ambientes ácidos (Nagele *et al.*, 2010). Igualmente, cambios artificiales de *pH* en el apoplasto por la introducción de vapor de ácido clorhídrico (*HCl*) o amoníaco (*NH₃*) en el medio gaseoso, causó mayor intensidad de fotosíntesis así como mayor acumulación de asimilados marcados con ¹⁴C (sacarosa) en el apoplasto de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) favoreciendo la relación Fuente-Demanda de asimilados y la acumulación de biomasa (Chikov *et al.*, 2009).

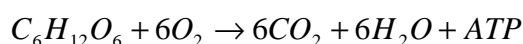
Una vez un cultivo ha maximizado la interceptación de la luz y la repartición de los asimilados hacia el producto de importancia económica, la investigación presente y futura requerirá, para lograr mayores rendimientos, del incremento en las tasas fotosintéticas y producción de almidón y sacarosa, apuntando a mejorar entre variadas

opciones, la actividad carboxilasa de *Rubisco* sobre la oxigenasa, o a través de manipulación genética optimizar la distribución de los carbohidratos al órgano de cosecha (Viator *et al.*, 2005; Evans y von Caemmerer, 2011; Whitney *et al.*, 2011).

2.3 Respiración

La respiración es un proceso esencial para el crecimiento y acumulación de biomasa y juega un papel fundamental en el balance de carbono de células individuales, tejidos, órganos e individuos y finalmente del ecosistema, siendo determinante de la productividad primaria neta (González-Meler *et al.*, 2004). Los compuestos orgánicos reducidos en la fotosíntesis son movilizados y, posteriormente, a través de un proceso de combustión controlada son oxidados, con liberación de energía que es almacenada transitoriamente como *ATP*; ésta energía se utiliza para permitir las reacciones metabólicas asociadas al crecimiento, la diferenciación y el mantenimiento de la planta. Por otro lado, la ruta respiratoria suministra metabolitos intermedios que sirven como sustratos para la síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos y ácidos grasos entre otros (Van Iersel, 2003).

El principal sustrato respirado es la glucosa, sin embargo, otros compuestos que contribuyen al proceso son la sacarosa, hexosas fosfato y *TP* provenientes de la degradación del almidón y de la fotosíntesis, fructanos, lípidos, ácidos orgánicos, y ocasionalmente, proteínas. Su reacción general es:



donde la glucosa se oxida para producir CO_2 y el oxígeno se reduce para producir H_2O .

Durante la respiración se presentan cuatro eventos fundamentales; el primero sucede en el citoplasma y los restantes en la mitocondria, así:

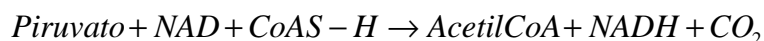
a. Glicólisis: es la secuencia de reacciones metabólicas que convierten la glucosa en piruvato y producen una cantidad relativamente pequeña de *ATP*. Es un proceso universal ya que sucede en todas las células. La glicólisis puede realizarse anaeróbicamente, convirtiéndose así en una ruta importante para los organismos que realizan la fermentación de los azúcares. En los organismos aeróbicos es el proceso previo necesario para llevar a cabo la respiración aerobia, sirviendo igualmente como fuente de materia prima para la síntesis de otros compuestos (Fisher, 2000; Taiz y Zeiger, 2002).

Durante la glicólisis suceden los siguientes eventos: formación de *FBP* a partir de glucosa, formación de *GA3P* por lisis e isomerización, fosforilación acoplada a la oxidación del *GA3P* en ausencia de O_2 , formación de *ATP* a partir del 1,3 difosfoglicerato, formación de piruvato y generación de un segundo *ATP* (Fisher, 2000; Taiz y Zeiger, 2002).

Como resultado neto, a partir de una molécula de glucosa se generan 2 *ATP*, 2 *NADH* y 2 piruvatos. Las moléculas de *ATP* y *NADH* se utilizan para los procesos de síntesis de diversas moléculas en el metabolismo de la planta. Las moléculas de piruvato pueden

seguir la ruta de la fermentación o la ruta de respiración aerobia en la mitocondria. (Fisher, 2000; Taiz y Zeiger, 2002).

b. Descarboxilación del piruvato: el piruvato, producto de la degradación de los carbohidratos, ácidos grasos y la mayoría de los aminoácidos, se oxida en la matriz mitocondrial a CO_2 y H_2O , mediante el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Previo al ingreso al ciclo de Krebs, éste debe ser descarboxilado, a través del complejo enzimático de la piruvato dehidrogenasa (*PDH*), en una reacción exotérmica (Fisher, 2000; Taiz y Zeiger, 2002), así:



c. Ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico: es una ruta donde la acetil coenzima A (*A-Coa*), producto de la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico, se une al oxaloacetato produciendo una molécula de ácido cítrico que luego se convierte, mediante la acción de ocho enzimas específicas a isocitrato, α -cetoglutarato, succinil Co-A, succinato, fumarato, malato y finalmente regeneración del oxalacetato, completando el ciclo. En general, el proceso es de oxidación-reducción, y como resultado se liberan tres moléculas de CO_2 . Los electrones se almacenan temporalmente en tres moléculas de *NADH*, una de *FADH*₂ y una de *ATP* (Fisher, 2000; Taiz y Zeiger, 2002).

d. Fosforilación oxidativa: la transferencia electrónica se lleva a cabo mediante una cadena de centros de oxidación-reducción ligados a la membrana interna de la mitocondria, denominada cresta. Estos centros catalizan la transferencia de los electrones del *NADH* y el *FADH*₂, generados en el ciclo de Krebs, hasta el oxígeno para formar H_2O ; durante esta transferencia se libera energía que es almacenada en forma de tres moléculas de *ATP* (Fisher, 2000; Taiz y Zeiger, 2002).

Cuando se realiza el balance energético de la respiración aerobia, se encuentra que sumando las dos moléculas de *ATP* de la glicólisis, se producen en total 36 moléculas de *ATP* por cada molécula de glucosa oxidada; así, la respiración aerobia es mucho más eficiente que la anaerobia (Fisher, 2000; Taiz y Zeiger, 2002).

La respiración es un reflejo de la demanda metabólica, donde tejidos, órganos o plantas jóvenes respiran a mayores tasas que tejidos maduros o senescentes; en estados tempranos del crecimiento las altas tasas están relacionadas con los requerimientos metabólicos de células en rápida división y elongación; en la medida que los órganos maduran o senescen la respiración disminuye; en ramas y tallos leñosos la respiración disminuye con el crecimiento ya que la proporción relativa de tejido no respiratorio es mayor (Hopkins and Hüner, 2004).

2.3.1 Respiración de Crecimiento y Mantenimiento en los vegetales

Para crecer las plantas oxidan sustratos con el fin de reducir y construir productos carbonados intermedios, usando *ATP* y *NADPH* principalmente. La energía derivada del proceso respiratorio se utiliza para mantener la homeostasis del sistema y normalmente debe ser direccionada hacia dos actividades: el crecimiento y expansión celular, y el mantenimiento de la biomasa ya formada. Algunos autores incluyen en sus

modelos la energía necesaria para el transporte iónico; otros, la energía disipada en forma de calor denominada “wastage” (Amthor, 2000). La medición de los componentes de crecimiento y mantenimiento en la respiración vegetal es altamente compleja, y aún en la actualidad no se cuenta con metodologías precisas y confiables que separen todos los procesos involucrados (Amthor, 2000; van Iersel, 2003), aunque existen diversos modelos matemáticos que tratan de describirlos (Penning de Vries, 1974, 1975; Cannell y Thornley, 2000; Thornley y Cannell, 2000).

El mantenimiento incluye procesos que permiten sostener las estructuras celulares y los gradientes iónico y de metabolitos al interior de la célula, acompañada por una aclimatación celular o ajuste fenotípico a los cambios ambientales. El cambio del grupo enzimático que acompaña la ontogenia de las plantas es también considerado gasto de mantenimiento. Los principales procesos son la degradación y oxidación de macromoléculas y su posterior re-síntesis, para así mantener la funcionalidad celular, con la consecuente liberación de CO_2 ; tales procesos son altamente consumidores de *ATP* (Amthor, 2000). En la actualidad se ha sugerido que hay un potencial interesante en incrementar la productividad vegetal, a través de la selección de genotipos más eficientes por una menor respiración de mantenimiento, como lo sugirió en su época Wilson (1975) en trabajos desarrollados con *Lolium perenne* L., donde encontró relación inversa entre respiración y crecimiento en hojas completamente maduras, sugiriendo que el componente respiratorio era de mantenimiento debido al estado de desarrollo del tejido en estudio y a la baja actividad de procesos que reflejan crecimiento, como las tasas de translocación de asimilados.

Por su parte, la respiración de crecimiento produce energía que permite la formación y acumulación de nuevo material vegetal a través de diferentes subprocesos, tales como la reducción de nitratos y sulfatos, la toma activa de sustratos minerales y orgánicos al interior de las células en crecimiento, síntesis de monómeros a partir de sustratos, polimerización y ayuda al mantenimiento. Adicionalmente, el ingreso activo de minerales vía raíces y la carga del floema en tejidos fuente, hacen parte del componente de crecimiento y consumen energía para su ocurrencia (Amthor, 2000).

2.3.2 Fotorespiración

La fijación inicial del CO_2 en las plantas superiores es catalizada por *Rubisco*, que por su función carboxilasa permite la formación de metabolitos primarios; igualmente, esta enzima cataliza la reacción oxigenasa para producir una molécula de 3-PGA y una molécula de ácido fosfoglicólico, compuesto de dos carbonos, convirtiéndose en un proceso que consume O_2 y libera CO_2 a partir de los productos recién formados por las reacciones del ciclo de Calvin. Aunque algunas de las reacciones de la ruta fotorrespiratoria suceden en el cloroplasto y en la mitocondria, muchas de ellas ocurren en el peroxisoma. Debido a éste proceso las especies C_3 que crecen bajo condiciones atmosféricas normales (21% O_2 y 380 ppm de CO_2 aproximadamente) pierden hasta el 40% del CO_2 neto asimilado, disminuyendo la producción de asimilados fotosintéticos y la acumulación de materia seca, afectando así la productividad vegetal; por ello a las plantas C_3 se les califica de ineficientes (Devlin, 1970; Bauwe *et al.*, 2010; Peterhansel y Maurino, 2011).

La fotorrespiración consume parte del *ATP* y el *NADPH* generados durante la fase lumínica, y el CO_2 producido permanece dentro de la hoja porque es recapturado eficientemente por las rápidas reacciones fotosintéticas dentro de los cloroplastos. Este es un proceso sustractivo energéticamente, ya que el CO_2 debe ser fijado nuevamente dentro de la hoja y, en consecuencia, se reduce su asimilación neta a partir del aire externo. Aún hoy se desconoce el verdadero papel del proceso fotorrespiratorio, sin embargo, se ha sugerido que uno de ellos es la protección de las plantas de procesos perjudiciales como la foto-oxidación, la cual sucede bajo condiciones de elevada radiación solar (Devlin, 1970; Lawlor, 1987; Taiz y Zeiger, 2002).

Finalmente, existe una fuerte relación entre los procesos de fotosíntesis, respiración, fotorrespiración, fuente y demanda de carbohidratos y asimilación del nitrógeno, con consecuencias importantes en la productividad primaria neta: la fotosíntesis provee la energía en forma de carbono fijado así como compuestos para los constituyentes celulares; ésta energía la utiliza la célula en los procesos de crecimiento y desarrollo a través de la respiración de acuerdo con su edad y estado fenológico; los productos intermedios del ciclo de Krebs se combinan con la asimilación del nitrato para la síntesis de aminoácidos; luego la energía fotosintética se usa en la reducción del nitrato, y la asimilación del nitrógeno genera aminoácidos para la síntesis de enzimas y proteínas involucradas en fotosíntesis y respiración (Hopkins y Hüner, 2004).

2.4 Dinámica de la movilización de asimilados

El movimiento del agua y los solutos en las plantas obedece a dos tipos de transporte: uno convectivo en el cual la solución sigue un gradiente de presión a lo largo de la ruta, y uno difusivo en el que el movimiento de las moléculas resulta de un gradiente de concentración u osmótico. En ambos, la tensión superficial de las paredes celulares es un parámetro fundamental para un transporte eficiente, tanto en el xilema como en el floema (Fisher, 2000; Kawabata *et al.*, 2005).

El transporte de agua y solutos involucra dos rutas funcionalmente diferentes: el xilema y el floema; éstas se mueven paralelamente a través de toda la planta. El volumen del fluido en el xilema es mayor que en el floema, y es dirigido por la tensión resultante de la pérdida de agua en el proceso transpiratorio; así mismo, la concentración de solutos en el floema es elevada, y su movimiento responde a un diferencial de presión de turgencia entre los órganos fuente y demanda. Así, los solutos en el xilema se mueven ascendentemente hacia los sitios de fotosíntesis y crecimiento en el tallo, mientras que el movimiento en el floema es tanto ascendente como descendente, y depende de las posiciones relativas de la fuente y la demanda (Fisher, 2000; Ayre *et al.*, 2003; Kawabata *et al.*, 2005).

Javot y Maurel (2002) citan varios autores quienes sugieren que los elementos del xilema que se encuentran llenos de agua, así como las paredes celulares interconectadas, deberían considerarse un mismo elemento, al que denominaron apoplasto, siendo este en cierto sentido la parte muerta de la planta, e incluye todas las paredes celulares de la corteza; así, las paredes endodérmicas y exodérmicas con bandas de Caspari son apoplasto, pero como son impermeables al agua, no suelen considerarse parte del apoplasto. Todas las traqueidas y vasos del xilema son parte del apoplasto, así como las paredes celulares en el resto de la planta, incluyendo las hojas,

el floema y otras células del súber. El resto de la planta o parte viva es el simplasto, que incluye el citoplasma de todas las células de la planta y que forman una unidad, ya que los protoplastos de células adyacentes están comunicados por los plasmodesmos (Kawabata *et al.*, 2005).

El proceso de fuente y demanda de asimilados se inicia desde el transporte al nivel celular, cuando los productos de la fotosíntesis son formados y posteriormente enviados a los órganos en crecimiento, para determinar la acumulación de biomasa de cada órgano y de la planta total (Fisher, 2000).

2.4.1 Desde el cloroplasto hacia los tubos cribosos del floema

Para el movimiento de los fotoasimilados desde los cloroplastos del mesófilo hacia los tubos cribosos del floema, son necesarios diversos pasos denominados descarga hacia el floema así: las *TP* formadas por fotosíntesis son transportadas al citosol y convertidas en sacarosa; en la noche el carbono almacenado en almidón sale del cloroplasto principalmente como glucosa o maltosa (Lu y Sharkey, 2006; Brautigam y Weber, 2011) y es convertido a sacarosa; luego ésta se mueve desde la célula del mesófilo a los elementos cribosos cercanos a ellas, denominado comúnmente transporte a cortas distancias, ruta que usualmente cubre un recorrido de 2 ó 3 diámetros de una célula; finalmente en un proceso denominado descarga hacia el floema, los azúcares son transportados a través de los elementos cribosos; luego la sacarosa y otros solutos son translocados a mayores distancias desde los órganos fuente, proceso conocido como exportación; dicha translocación a través del sistema vascular hacia el vertedero es denominado transporte a largas distancias (Thorpe y Minchin, 1996).

2.4.2 Desde el floema hacia los órganos de demanda

En general los procesos en los tejidos de demanda son inversos a los que ocurren en las fuentes y se denominan importación de la demanda (Thorpe y Minchin, 1996), los cuales se caracterizan por:

- 1- Descarga desde el floema: descarga de los azúcares importados a los tubos cribosos de los órganos de demanda.
- 2- Transporte a corta distancia: posterior a la descarga los azúcares son llevados a las células del tejido demandante a una corta distancia o transporte posterior a los elementos cribosos del órgano de demanda.
- 3- Almacenamiento y metabolismo: en el paso final, los azúcares son almacenados o metabolizados en las células de demanda.

Generalmente esta descarga es vía simplasto, pero cuando se trata del desarrollo de semillas, la descarga es vía apoplasto. Se ha demostrado que la importación hacia los órganos de demanda es un proceso que requiere energía, la cual se obtiene de los eventos de fotosíntesis y respiración mitocondrial (González-Meler *et al.*, 2004).

Los plasmodesmos conectan los citoplasmas de células adyacentes y permiten el movimiento de los solutos sin paso transmembranal, dando origen al simplasto, el cual ocurre con mayor frecuencia en los meristemos y correlaciona con tejidos específicos y eventos de desarrollo, además en tejidos adultos donde el simplasto no cesa totalmente; numerosos trabajos han demostrado que el flujo a través de los plasmodesmos es gobernado por el tamaño del soluto (hasta 1kDa) y el gradiente de concentración entre células adyacentes, siendo además pasivo y no selectivo; su ubicación, número y resistencia ofrecida al transporte juega un papel fundamental en la partición de los asimilados hacia los diferentes órganos de demanda (Oparka *et al.*, 1994; Zambryski, 2008; Lee y Cui, 2009; Rutschow *et al.*, 2011).

De acuerdo con la especie, la descarga del floema hacia los órganos de almacenamiento sigue las rutas simplástica y apoplástica: en papa (*Solanum tuberosum* L.) las evidencias ultraestructurales y fisiológicas demuestran que dicha descarga es completamente simplástica entre el sistema de exportación y las células del parénquima de almacenamiento, apoyado en la alta presencia de plasmodesmatas que comunican todo el sistema de transporte; en remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) la poca presencia de tales canales sugiere que la exportación de asimilados y la correspondiente descarga del floema es vía apoplasto, mientras que en zanahoria (*Daucus carota* L.), aunque su frecuencia es baja, ambas rutas son probablemente usadas, debido al arreglo de los plasmodesmos que ocasionalmente son encontrados (Zamsky, 1996).

Debido a que el transporte en el floema es gobernado por el gradiente de concentración de solutos, los procesos que afectan la concentración osmótica a lo largo de la ruta de transporte, controlan el flujo de asimilados (Zamsky, 1996; Kulikova *et al.*, 2009); así, la incorporación en la fuente implica el transporte lateral (desde los cloroplastos en las hojas) hasta el haz vascular, y su incorporación en el interior de las células o tubos cribosos mediante un proceso activo y selectivo; la acumulación de solutos en el interior del tubo criboso provoca el descenso del potencial hídrico y la entrada pasiva de agua, que dilata las paredes generándose una presión que impulsa la solución (Kulikova *et al.*, 2009). El contenido de los tubos cribosos se mueve a lo largo de la ruta por un proceso de flujo másico (movimiento de la solución) a favor de un gradiente de presión generado por las diferencias de concentración, y la descarga de los solutos en los sumideros mantiene este gradiente de concentraciones y determina la dirección del transporte en la planta; la alta resistencia hidráulica ofrecida por los plasmodesmos, acompañada por una disminución paulatina en la presión, hacen que éste movimiento sea irreversible (Guardiola y García, 1990, 1993; Fisher, 2000; Kulikova *et al.*, 2009), por lo tanto el transporte por el floema se considera uno de los principales factores en la integración y regulación de los procesos fisiológicos en todos los niveles de organización de las plantas (Ron'zhina, 2009).

Los asimilados y otros solutos son intercambiados constantemente entre los elementos cribosos, las células acompañantes y células del floema, así como a través del transporte lateral que es sustancial y necesario para abastecer el crecimiento de los tejidos de demanda, como lo es el cambium alrededor de los tejidos conductores (Kulikova *et al.*, 2009). Por su parte Turgeon (1989) sugiere que la función principal de la carga activa en el floema es direccionar el transporte a grandes distancias elevando la presión hidrostática en los elementos cribosos; en especies maderables, donde los asimilados recorren grandes distancias, la carga de solutos se hace pasivamente manteniendo altas concentraciones de sacarosa y en algunos casos azúcares alcohólicos

en las células del mesófilo, sugiriendo que la ventaja adaptativa de la carga activa del floema es permitir a las plantas mantener bajas concentraciones foliares de carbohidratos no estructurales (azúcares, azúcares alcohólicos y almidón), que permite a las hojas tener un mejor desempeño en la inversión en síntesis de carbohidratos, para lograr al final mayor acumulación de biomasa.

Mullendore *et al.* (2010) aducen que la presión en el floema y los parámetros anatómicos que definen la conductividad han evolucionado, tanto en herbáceas como en leñosas, de tal manera que se han optimizado para diversos propósitos, uno de los cuales es facilitar el transporte a grandes distancias más eficientemente; esto podría explicar el porqué los elementos cribosos evolucionaron para ser enucleados y contener así gran cantidad de proteínas y ácido ribonucleico (*RNA*) asociados a señales de transporte y de defensa, que hace mucho más eficiente el transporte de sustancias elaboradas (Lee y Cui, 2009).

2.4.3 Velocidad en el transporte de asimilados

El flujo de savia es generado por un gradiente de presión hidrostática a lo largo del recorrido, creado por una carga osmóticamente activa, principalmente de fotoasimilados, que promueve una alta concentración de solutos en los órganos fuente; la descarga permite mantener el gradiente de presión y el flujo de solutos hacia los órganos de demanda. Así, tanto la carga como la descarga se presentan simultáneamente, en diferentes tiempos y a diferentes velocidades, todo a lo largo de la ruta. El estudio de la velocidad y destino de los asimilados transportados es fundamental para entender diversas relaciones fisiológicas y genera claridad hacia una mejor productividad de los cultivos (Minchin y Torpe, 1993; Chikov *et al.*, 2009).

En este sentido la temperatura juega un papel fundamental, tanto en el comportamiento enzimático en el ciclo de Calvin para la producción de asimilados, como para el movimiento y transporte de los mismos a los diferentes órganos. Existen temperaturas en las cuales el movimiento y translocación de asimilados es mínimo, o temperaturas donde este transporte es máximo u óptimo; la primera se observa fundamentalmente cuando se alcanza un balance neto de cero entre fotosíntesis y respiración; la segunda cuando se logran las mayores tasas de fotosíntesis. Temperaturas de exportación menores o superiores a la óptima disminuirán el transporte de asimilados, lo cual repercutirá en el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Taiz y Zeiger, 2002).

La mayor parte de los estudios adelantados para conocer la dirección y velocidad del transporte de asimilados se han realizado con el trazador radiactivo del carbono, ^{14}C , a través de muestreos destructivos.

Terry (1971) marcó con éste isótopo hojas individuales de *B. vulgaris* L. durante 30 minutos, a temperaturas de 5°C, 15°C, 25°C y 35°C; encontró que las hojas jóvenes, maduras y tubérculos fueron marcados secuencialmente durante un período de 24 horas continuas de luz. En un segundo experimento marcó plantas completas de la misma especie a temperaturas de 10°C, 18°C, 26°C y 34°C, y evaluó en hojas y raíces las fracciones solubles e insolubles en etanol, por un período de 72 horas; encontró que la actividad específica en hojas y tubérculos fue mayor a 25°C dos horas después de la marcación, a 15°C y 35°C cuatro horas, y a 5°C seis horas después de marcadas, lo que sugiere que la temperatura óptima de exportación de asimilados es de 25°C; igualmente

encontró que la mayor parte de los compuestos marcados fueron transferidos a hojas o raíces en un período de 9 horas.

Con el fin de seguir la distribución de los asimilados hacia frutos en desarrollo, Toldan-Andersen (1998) marcó con ^{14}C en cuatro ciclos diferentes, plantas de cereza agria (*Prunus cerasus* L.) de tres años de edad, sembradas en materos; encontró el primer día de la marcación una alta actividad en la fracción soluble, donde el 90% de los compuestos marcados permanecieron en las hojas; dos días después de la marcación el 75% de los metabolitos solubles habían sido enviados fuera de las hojas; igualmente, durante los estados tempranos de desarrollo del fruto, aproximadamente el 30% de los compuestos fueron transportados a las partes solubles; las paredes celulares y el endocarpio en formación fueron los demandantes dominantes en este estado. Durante el desarrollo final, cerca de la madurez, aproximadamente el 80% de los compuestos trazados fueron encontrados en los sólidos solubles, dos días después de la marcación.

Hojas de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.), sembradas en materos bajo condiciones de invernadero, fueron marcadas con ^{14}C y posteriormente las colocaron a fotosintetizar durante una hora; la marcación se hizo sobre la primera hoja bajo el segundo racimo 30 días posterior a la antesis; diferentes órganos (pedúnculo del segundo racimo, sépalos, pedicelos etc.) se analizaron 2, 4, 8, 12, 20, 24, 48 y 72 horas posterior a la marcación; encontraron que el 85% de los compuestos marcados fueron enviados fuera de las hojas en las primeras 24 horas, y casi el 100% durante las primeras 72 horas (Qi *et al.*, 2006).

Otro isótopo radiactivo del carbono es el ^{11}C , el cual ha sido utilizado en menor proporción, debido a su corta vida media, para los mismos propósitos; Matsushashi *et al.* (2005) siguieron el movimiento de los asimilados recién elaborados en haba (*Vicia faba* L.) en mediciones *in vivo* usando un *Positron Emitting Tracer Imaging System* (PETIS); con modelos matemáticos pudieron describir la velocidad media de transporte de los asimilados así como su distribución espacial.

2.5 Relación Fuente - Demanda

En 1967, Warren-Wilson citado por Zamsky (1996), introdujo el término “Fuerza de la demanda” como la capacidad de obtener asimilados en un sistema en competencia, determinado por:

$$\text{Fuerza de la demanda (g d}^{-1}\text{)} = \text{tamaño de la demanda (g)} \times \text{actividad de la demanda (g}^{-1}\text{ d}^{-1}\text{)}$$

donde el tamaño de la demanda es la biomasa producida por la planta (peso seco total), y su actividad determinada fundamentalmente por la respiración, tanto de crecimiento como de mantenimiento.

Por su parte, Minchin y Thorpe (1993) sugirieron que el término fuerza de la demanda no es apropiado, ya que el abastecimiento de asimilados no es únicamente determinado por la demanda; proponen entonces un modelo en el que el flujo hacia un órgano vertedero está influenciado por la interacción entre la fuente, órganos de demanda alternativos y el órgano de demanda en sí mismo; sugieren, por tanto, que las

relaciones Fuente-Demanda en los vegetales están determinadas por la siguiente igualdad:

$$\text{Tamaño de la Fuente} * \text{Actividad de la Fuente} = \text{Tamaño de la Demanda} * \text{Actividad de la Demanda}$$

donde el tamaño de la fuente es el área foliar (o número de hojas), su actividad es la tasa fotosintética que a su vez genera la tasa a la cual se sintetiza el almidón, la sacarosa y demás metabolitos primarios y secundarios, y para la demanda las mismas consideraciones anteriores.

Debido a que el metabolismo vegetal es sumamente complejo y las relaciones Fuente-Demanda se comportan como un sistema altamente dinámico, la utilización de estos términos, por su simplicidad es válida, y permite una organización sustancial en los diferentes niveles de la fisiología de las plantas y en la comprensión del proceso de productividad primaria neta (Stitt, 1993).

De otra parte, Blanke (2009) define la fuente como el tejido fotosintético u órgano que exporta esqueletos de carbono, y el vertedero como el órgano que requiere del material importado para su subsistencia; además sugiere que la fuerza del vertedero es la capacidad del órgano de atraer asimilados, su tamaño es la capacidad de almacenarlos y finalmente su actividad está dada por la tasa de respiración.

La fuente y el vertedero, bajo condiciones adecuadas, forman un sistema autoregulado y bien balanceado en las plantas; sin embargo, éste mecanismo permanece aún sin dilucidar completamente; las relaciones entre los diferentes órganos no son aún muy claras, y el proceso de transporte y repartición de asimilados tiene grandes vacíos (Ron'zhina, 2009).

2.6 Fotosíntesis y Relación Fuente-Demanda

Actualmente se han logrado grandes progresos en la determinación de los mecanismos por los cuales el carbono fijado fotosintéticamente es distribuido en los diferentes órganos de los vegetales, donde la fuerza de órganos fuente y demanda juega un papel preponderante en una eficiente redistribución. Así mismo, se ha observado como una limitante no conocer con mayor profundidad dichos mecanismos, en detrimento de la productividad vegetal.

La fotosíntesis y el metabolismo de los carbohidratos en órganos fuente están altamente influenciados por la actividad del órgano de demanda. Generalmente, cuando la fuerza de la demanda aumenta, la tasa de fotosíntesis se incrementa y una mayor cantidad de carbono es dirigida hacia la formación de sacarosa en lugar de almidón, proceso que facilita su transporte hacia los órganos de destino. De otro lado, cuando el transporte de fotoasimilados hacia la demanda es bloqueado, la fotosíntesis es inhibida, la síntesis de sacarosa se reduce y la de almidón se incrementa; dicha regulación implica cambios en los niveles de metabolitos formados, en la actividad de las enzimas que sintetizan sacarosa y almidón, y en la transcripción de genes específicos involucrados en el proceso fotosintético y en el metabolismo de los carbohidratos (Zhou y Quebedeaux, 2003; Waclawowsky *et al.*, 2006).

Históricamente el mejoramiento en el rendimiento potencial de los cultivos tiene sus bases en una mejor distribución de los fotoasimilados hacia el órgano económicamente importante; así mismo y dado que el mayor porcentaje del peso seco de las plantas consiste en compuestos de carbono, el incremento en el rendimiento de las cosechas está íntimamente ligado a mejoras en la fijación del carbono por unidad de área (mejor eficiencia fotosintética) y la posterior distribución a los órganos que se cosechan y los que no (Gifford *et al.*, 1984; Viator *et al.*, 2005).

Debido a la gran complejidad del sistema fotosintético en la planta, ya que la respuesta a la luz y la fijación del CO₂ se da en cuestión de nanosegundos, no ha sido posible incrementar el rendimiento de los cultivos a través de una mejor eficiencia fotosintética, o eficiencia en el proceso de toma de luz y CO₂ (Ort y Long, 2002). Así, el incremento progresivo en el potencial de rendimiento de los cultivos como *T. aestivum* L., cebada (*Hordeum vulgare* L.) y soya (*Glycine max* L.), no se ha asociado con un incremento en su biomasa, sino en una mejor redistribución de los fotoasimilados; igualmente, Donald y Hamblin (1976) sugirieron que un mejor rendimiento de cultivos como *T. aestivum* L., *Z. mayz* L., *Lycopersicum* sp. y *O. sativa* L. ha ocurrido sin incremento alguno en sus tasas de crecimiento relativo; más bien ha sido la partición y distribución de los productos fotosintéticos, entre el órgano de importancia económica y el resto de la planta (IC-Índice de Cosecha) lo que lo ha causado. Así, el mejoramiento en el IC ha sido el responsable del incremento en la productividad de los principales cultivos de cereales en el mundo (Gifford y Evans, 1981).

Austin *et al.* (1980) compararon ocho de los principales cultivos de *T. aestivum* L. en Inglaterra durante un período de 70 años; observaron que no hay una tendencia al incremento en el peso seco total de las plantas, más si un incremento de 5-7 toneladas de granos Ha⁻¹, y como el IC pasó de 0.35 a 0.5, bajo las mismas condiciones de campo a través del tiempo.

2.7 Relación Fuente - Demanda en café

Los factores que controlan la producción y productividad del cultivo del café son: el tamaño de la superficie foliar disponible para absorber CO₂ y luz (fotosíntesis), la tasa de absorción de CO₂ por unidad de área foliar (eficiencia en el uso de la luz) y la distribución de la materia seca entre semillas y otras partes de la planta o relación Fuente-Demanda (Cannell, 1971, 1975).

Cannell y Huxley (1969) marcaron con ¹⁴C plantas de *Coffea arabica* L. cv. SL28 en estado vegetativo y reproductivo, durante dos períodos de lluvia: cortos y largos, con el fin de seguir la ruta de los compuestos marcados. Las determinaciones se hicieron 26 horas después del proceso, por medio de autoradiografía. Encontraron diferencias en la fuerza de la demanda (ápices de ramas, frutos, tallos y raíces) entre períodos; la fuerza de tallos y raíces, durante el crecimiento vegetativo fue menor que la de las ramas; los asimilados utilizados para el crecimiento de frutos no alteraron el patrón de distribución de otros vertederos hacia el final del período corto de lluvias, pero si restringen el movimiento hacia los puntos de crecimiento de ramas y tallos al inicio del período de lluvias prolongadas; en la estación seca y cuando había frutos, todos los asimilados se dirigieron hacia ellos. En general las autoradiografías mostraron que los

asimilados se dirigieron hacia los puntos de crecimiento y hojas en expansión, frutos, floema y xilema.

Otro estudio sobre la distribución de la materia seca en ramas con presencia o ausencia de frutos y/u hojas comparó la distribución de los carbohidratos en el desarrollo de ramas testigo, defoliadas, aquellas que se les quitaron flores (defloradas) y aquellas que se les hizo un corte circular al floema en la base de las ramas (anilladas); las ramas testigo aumentaron rápidamente de peso al comenzar a expandirse sus frutos, debido probablemente a los carbohidratos importados y a su mayor capacidad fotosintética neta; en las ramas defoliadas hubo una mayor pérdida de frutos jóvenes que en las no defoliadas, debido básicamente a una compensación parcial por la pérdida de hojas. Estas plantas pueden agrupar y retener hasta 8000 frutos en un solo tallo tomando hasta el 70% del total de carbohidratos netos producidos por la planta y aproximadamente el 90% del total de los minerales aportados por el suelo (Cannell, 1971). Según el mismo autor el cultivo del café es poco eficiente fotosintéticamente ya que dirigió un 40% del incremento en peso seco anual hacia las hojas, comparado con un 22% en árboles de manzana (*Malus domestica* L.) de dos años de edad, encontrando en *Coffea* sp. una tasa de asimilación neta (TAN) en el límite más bajo entre especies perennes tropicales.

Bajo condiciones adecuadas de clima y nutrientes el área foliar mínima necesaria para soportar un fruto y que permita un crecimiento vegetativo satisfactorio para el año siguiente es alrededor de 20 cm² (Cannell, 1971); así, solo 2-3 frutos podrían ser adecuadamente soportados sobre cada nudo que tiene 2 hojas desarrolladas (20-30cm² cada una), lo que sugiere que los frutos se alimentan de hojas de ramas laterales e incluso de hojas ubicadas en nudos diferentes a las ramas donde se encuentran (Cannell, 1971); Gómez y Riaño (2005) encontraron un valor de 19.6 cm² (área foliar) fruto⁻¹, lo cual sugiere que a través del tiempo, en éste sentido, la relación Fuente-Demanda no ha sufrido cambios importantes.

En plantas de la variedad Mundo Novo de 2.5 años de edad, Almeida *et al.* (1982) realizaron defoliaciones parciales de 0% (Testigo) 60% y 90% previo a la floración; encontraron caída de frutos proporcional a la defoliación (25% y 50% con respecto al testigo), 75 a 90 días posterior a la floración. El número final de frutos por nudo productivo fue de 8.5, 6.4 y 4.3, las hojas por rama al final fue 13.5, 13.4 y 9.5, el café cereza por planta fue de 4.8, 3.5 y 2.5 kg. y el porcentaje de frutos vanos de 3.3, 4.9 y 5.3, para las defoliaciones de 0%, 60% y 90% respectivamente.

En otro estudio, a plantas de Catimor UFV-1359 en Brasil se les retiró el 50% y 100% de las flores más los frutos pequeños presentes en dos épocas: al momento de la floración y 105 días después. El retiro del 100% en plena floración, promovió un mayor crecimiento vegetativo, tanto en longitud de ramas como en número de ramas secundarias, comparado con las plantas testigo. El retiro del 50% en el mismo período, aumentó la materia seca de los restantes frutos; cuando se hizo a los 105 días el peso de los frutos restantes fue intermedio entre el retiro al momento de la floración y las plantas testigo. Se concluyó que retirar el 50% de flores y frutos pequeños al momento de la floración, aumenta el peso seco por fruto de los restantes y evita su caída. La producción para el tratamiento del 50% fue semejante a la producción de las plantas testigo (Carvalho *et al.*, 1984).

Akunda (1990) encontró en cultivares SL28 y SL34 de *C. arabica* L., en las condiciones de Kenya (1600 m.s.n.m), que la poda del 25% del área foliar total mejoró la asimilación de CO₂ y redujo las pérdidas por transpiración.

Por su parte Arcila (1991) estudió el efecto de la defoliación manual mensual en relación con la producción de plantas de *C. arabica* var. Colombia, en las condiciones de la zona cafetera central colombiana. Cuando se defoliaron plantas totalmente entre Noviembre y Abril, éstas se recuperaron fácilmente, período coincidente con el de poscosecha, floración y rápida formación de hojas; el mismo tratamiento entre Mayo y Octubre causó en las plantas tendencia a perder sus ramas y aún morir, más marcadamente en los meses de Julio y Agosto, período coincidente con la etapa rápida de crecimiento del fruto; la reducción en la producción por ésta defoliación fue del 50%-70% para el mismo año y 80% para el siguiente. Igualmente, la defoliación parcial (45%-60%) causó pérdidas en la producción hasta del 30% para el mismo año y 20-40% para el siguiente, y las plantas recuperaron el follaje a los valores iniciales independiente de la época de defoliación; finalmente la defoliación en la época de floración tuvo más efecto en la producción el mismo año que en el siguiente. Los anteriores resultados reflejan la respuesta del café a variaciones en su relación Fuente-Demanda.

En otro estudio, Riaño *et al.* (2004) estudiaron bajo diversas condiciones ambientales de la zona cafetera central colombiana, la acumulación y distribución de materia seca en plantas de Variedad Colombia; encontraron que la producción de materia seca por planta siguió un comportamiento sigmoide con valores máximos de acumulación cercanos a 10 Kg. planta⁻¹ al cabo de 5 años de edad; concluyeron que la dinámica en el crecimiento es similar para las tres localidades, pero más importante es que la distribución en los diferentes órganos se vio afectado por el ambiente asociado a cada una de ellas, determinando los patrones de redistribución y acumulación en los frutos, y por tanto, la magnitud de la producción y el IC.

Con el fin de observar la respuesta en intercambio gaseoso (fotosíntesis y respiración), crecimiento y acumulación de materia seca (relación Fuente-Demanda) en plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Caturra de 16 meses de edad, sembradas en materos, Gómez y Riaño (2005) realizaron un desbalance manual sistemático en los órganos fuente de carbohidratos (hojas) y demanda (frutos en sus estados iniciales de crecimiento) del 25%, 50% y 75%. Igualmente realizaron un corte severo a la raíz, con el retiro de al menos un 50% de sus raíces absorbentes. Observaron que las plantas se afectaron severamente cuando perdieron el 50% o más de su aparato fotosintético. Aún ocho meses después de aplicados los tratamientos, presentaron un comportamiento en todas las variables menor que las plantas testigo y que la pérdida del 25% del follaje. Cuando se retiraron manualmente los frutos, observaron que los asimilados sintetizados para su llenado, ante su ausencia, se dirigieron hacia otros órganos de demanda en las plantas, preferencialmente hacia los de soporte como tallos, ramas y raíces, afectando al inicio el proceso de intercambio gaseoso, pero normalizándolo en la medida que transcurrió el tiempo; el corte radical afectó severamente todas las variables medidas, asemejándose dicho tratamiento al retiro manual del 75% del follaje. Concluyeron que la pérdida de hasta el 25% del follaje no afecta el normal crecimiento y desarrollo de las plantas.

Cunha *et al.* (2007) en un trabajo similar al anterior encontraron que la tasa de crecimiento de ramas, el número de nudos y la ganancia en área foliar fueron significativamente menores cuando se retiró el 50% de las hojas y se dejó el 100% de los frutos; el peso seco promedio por fruto fue significativamente superior (39%) cuando se retiró el 50% de los frutos y se dejó el 100% de las hojas; la abscisión y producción de granos vanos fue 32% superior al retirar el 50% de las hojas y dejar todos los frutos en la planta. En general los resultados sugieren que la disminución en la relación Fuente/Demanda afecta negativamente el crecimiento y desarrollo del café (*Coffea sp.*) lo que causa la bienalidad del cultivo. Para este mismo trabajo la tasa promedio de fotosíntesis y conductancia estomática fue significativamente superior (>50%), y la composición isotópica del carbono en el material orgánico inferior, en árboles con todos los frutos y la mitad del área foliar que en aquellos sin los frutos y todas sus hojas, con valores intermedios para los otros tratamientos; las diferencias al parecer no fueron causadas por alteraciones fotoquímicas o por algún efecto de retroalimentación debido a una menor fotosíntesis; se relacionó más con una baja disponibilidad de CO₂ por una disminución en la conductancia estomática en aquellos tratamientos con menores valores (DaMatta *et al.*, 2008).

El uso del isótopo estable ¹³C, en estudios en el cafeto es limitado, principalmente a la respuesta de la eficiencia en el uso de agua (EUA) (Meinzer *et al.*, 1992; Gutiérrez y Meinzer, 1994). De otra parte, se evaluó la composición isotópica del carbono ($\delta^{13}C$) en *Coffea arabica* L. variedades Catuai Vermelho, Mundo Novo, Borbón e Icatu Amarillo, *C. canephora* cvs. Apoata y Guarani, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. salvatrix* y *C. stenophylla*, con relación a la ruta fotosintética y su anatomía foliar; se encontró alta correlación entre $\delta^{13}C$ y las características anatómicas observadas, tal como se reporta en otras especies con metabolismo fotosintético C₃ (Carelli *et al.*, 2003).

En general no se encuentran trabajos en *Coffea sp.* en los cuales se haya medido la velocidad del transporte y la composición de los asimilados bajo la metodología de enriquecimiento con ¹³CO₂/¹²CO₂ diferencial.

2.8 Bibliografía general

Ainsworth, E.A.; Bush, D.R. 2011. Carbohydrate Export from the Leaf: A Highly Regulated Process and Target to Enhance Photosynthesis and Productivity. *Plant Physiology* 155:64-69.

Akunda, E.M.W. 1990. Physiological aspects of productivity in coffee: Some aspects of water relations and dry matter production of *Coffea arabica* L. in Kenya. *In: INTERNATIONAL Congress of Plant Physiology*. New Delhi (India), February 15-20, 1988. Proceedings. Vol. 1. Eds New Delhi (India), Society for Plant Physiology and Biochemistry. p. 404-425.

Almeida, S.R. De.; Matiello, J.B.; Miguel, A.E. 1982. Efeito da densidade foliar sobre a queda de frutos e a producao do cafeeiro. *In: Colloque Scientifique International Sur le Café*, 10. Octobre 11-14. p 463-466.

Amthor, J.S. 2000. The McCree - de Wit - Penning de Vries - Thornley respiration paradigms: 30 years later. *Annals of Botany* 86:1-20.

Aranjuelo, I.; Pardo, T.; Biel, C.; Savé, R.; Azcón-Bieto, J.; Nogués, S. 2009. Leaf carbon management in slow-growing plants exposed to elevated CO₂. *Global Change Biology* 15:97-109.

Arcila P., J. 1991. Foliage development and production of the coffee plant. *In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café*, 14. San Francisco (Estados Unidos), Julliet 14-19. París (Francia), ASIC. p. 78.

Austin, R.B.; Bingham, J.; Blackwell, R.D.; Evans, L.T.; Ford, M.A.; Morgan, C.L.; Taylor, M. 1980. Genetic improvements in winter wheat yields since 1900 and associated physiological changes. *Journal of Agricultural Science* 94:675-689.

Ayre B.G.; Keller, F.; Turgeon, R. 2003. Symplastic continuity between companion cells and the translocation stream: long-distance transport is controlled by retention and retrieval mechanisms in the phloem. *Plant Physiology* 131:1518-1528.

Azcon B., J.; Talon, M. 1993. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Madrid (España), McGraw-Hill Interamericana. 581p.

Bassham, J.A.; Calvin, M. 1957. The path of carbon in photosynthesis. Englewood Cliffs, NJ (Estados Unidos), Prentice-Hall, Inc. 104p.

Battistelli, A.; Adcok, M.D.; Leegood, C. 1991. The relationship between the activation state of sucrose-phosphate synthase and the rate of CO₂ assimilation in spinach leaves. *Planta* 183:620-622.

Bauwe, H.; Hagemann M.; Fernie, A.R. 2010. Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Science* 15:330-336.

Beck, E.; Ziegler, P. 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:95-117.

Blanke, M.M. 2009. Regulatory mechanisms in source sink relationship in plants – A review. *Acta Horticulturae* 835:13-20.

Bowyer, J.R.; Leegood, R.C. 1997. Photosynthesis. *In: Plant biochemistry*. Dey, P.M.; Harborne, J.B. eds. Academic Press, London. p. 49-110.

Braütigam, A.; Weber, A.P.M. 2011. Do Metabolite Transport Processes Limit Photosynthesis?. *Plant Physiology* 155:43-48.

Burrell, M.M. 2003. Starch: the need for improved quality or quantity-an overview. *Journal of Experimental Botany* 54 (382):458-456.

Campbell, W.J.; Ogren, W.L. 1990. A novel role for light in the activation of ribulose biphosphate carbaxilase/oxygenase. *Plant Physiology*. 92(1):110-115.

Cannell, M.G.R.; Huxley, P.A. 1969. Seasonal differences in the pattern of assimilate movement in branches of *Coffea arabica* L. *Annals of Applied Biology* 64(2):345-357.

Cannell, M.G.R. 1971. Effects of fruiting, defoliation and ring-barking on the accumulation and distribution of dry matter in branches of *Coffea arabica* L. in Kenya. *Experimental Agriculture* 7(1):63-74.

Cannell, M.G.R. 1975. Crop physiological aspects of coffee bean yield: a review. *Journal of Coffee Research* 5(12):7-20.

Cannell, M.G.R.; Thornley, J.H.M. 2000. Modelling the components of plant respiration: some guiding principles. *Annals of Botany* 85:45-54.

Carelli, M.L.C.; Queiroz V., R.B.; Fahl, J.I.; Trivelin, P.C.O. 2003. Leaf anatomy and carbon isotope composition in *Coffea* species related to photosynthetic pathway. *Brazilian Journal of Plant Physiology (Brasil)* 15(1):19-24.

Carvalho, C.H.S.; Rena, A.B.; Pereira, A.A. 1984. Influencia do desbaste de flores e frutos sobre os crescimentos vegetativos e reprodutivo do *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 11. Londrina (Brasil), Outubro 22-25. p 86-87.

Chikov, V.I.; Abdrakhimov, F.A.; Bakirova, G.G.; Batasheva, S.N. 2009. The role of Sink-Source relationships between different organs in regulation of photosynthesis and productivity. In: *Proceedings of the International Symposium on Source-Sink Relationship in Plants. Acta Horticulturae* 835:87-98.

Cunha, R.L. DA; Martins, S.C.V.; Celin, E.F.; Wolfgramm, R.; Batista, K.D.; Caten, A.T.; Chaves, A.R.M.; DaMatta, F.M. 2007. Variacoes no crescimento vegetativo e reprodutivo em resposta à manipulação da razão fonte:dreno, em (*Coffea arabica* L.) sob condições de campo. In: SIMPOSIO de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 5. Aguas de Lindóia (Brasil), Maio 7-11. 6p.

DaMatta, F.M.; Rodríguez L., N.F. 2005. Fotosíntesis, distribución y asignación de asimilados en plantas leñosas perennes. *Revista Comalfi* 32(1):35-42.

DaMatta, F.M.; Cunha, R.L.; Antunes, W.C.; Martins, S.C.V.; Araujo, W.L.; Fernie, A.R.; Moraes, G.A.B.K. 2008. In field-grown coffee trees source–sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytologist* 178:348–357.

Devlin, R.M. 1970. Fisiología vegetal. Ediciones Omega. Barcelona, España. 137-157.

Donald, C.M.; Hamblin, J. 1976. The biological yield and harvest index of cereals and agronomic and plant breeding criteria. *Advances in Agronomy* 28, 361-405.

Dunford, S. 2002. Translocation in the floem. In: *Plant Physiology*. Taiz and Zeiger (eds.). Sinauer Assoc., Inc., Publ., Sunderland, Mass. pp 193- 222.

Edelman, J.; Yudkin, J.; Hough. L. 1971. Sugar; chemical, biological and nutritional aspects of sucrose. Londres (Inglaterra) Butterworth. 246 p.

Evans, J. R.; von Caemmerer, S. 2011. Enhancing photosynthesis. *Plant Physiology* 155, p. 19.

Fisher, D.B. 2000. Long-Distance Transport. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. eds. Rockville (Estados Unidos), American Society of Plant Physiologist, 1367 p.

Foyer, C.H.; Galtier, N. 1996. Source-Sink interaction and communication in leaves. *In: Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships*. Zamski, E.; Schaffer, A.A. eds. pp. 311-340.

Geigenberger, P. 2003. Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany* 54 (382):457-465.

Gifford, R.M.; Evans, L.T. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning and yield. *Annual Review of Plant Physiology* 32:485-509.

Gifford, R.M.; Thorne, J.H.; Hitz, W.D.; Giaquinta, R.T. 1984. Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science* 225:801-808.

Glasziou, K. T.; Gayler, K.R. 1972. Storage of sugars in stalks of sugar cane. *Botanical Review* 38:471-490.

Gómez G., L.F.; Riaño H., N.M. 2005. Fotosíntesis y relación Fuente-Demanda en plantas completas de café *Coffea arabica* L. *In: CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Malezas y Fisiología Vegetal*, 35. Medellín (Colombia), Agosto 17-19. Resumen memorias.

González-Meler, M.A.; Taneva, L.; Trueman, R.J. 2004. Plant respiration and elevated atmospheric CO₂ concentration: cellular responses and global significance. *Annals of Botany* 94:647-656.

Guardiola, J.L.; García, L.A. 1990. Fisiología Vegetal 1: Nutrición y Transporte. Madrid (España), Editorial Síntesis. 440 p.

Guardiola, J.L.; García, L.A. 1993. Transporte de azúcares y otros asimilados. *In: Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcon-Bieto, J.; Talon, M. Eds. McGraw-Hill-Interamericana de España. pp 149-171.

Gutierrez, M.V.; Meinzer, F.C. 1994. Carbon isotope discrimination and photosynthetic gas exchange in coffee hedgerows during canopy development. *Australian Journal of Plant Physiology* 21(2):207-219.

Hopkins, W.G.; Hüner, N.P.A. 2004. Introduction to Plant Physiology. 3rd Edition. New York (Estados Unidos), John Wiley and Sons. 560p.

Huber, S.C.; Huber, J.L.; McMichael Jr., R.W. 1993. The regulation of sucrose synthesis in leaves. *In: Carbon partitioning within and between organisms*. Pollock, J.; Farrar, F.; Gordon, A.J. eds. Oxford:Bios Science 1-26.

Huber, S.C.; Huber, J.L. 1992. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiology* 99:1275-1278.

Huber, S.C. 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:431-444.

Javot, H.; Maurel, C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany* 90:301-313.

Jenner, C. F. 1982. Storage of starch. *In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Vol 13A, Plant Carbohydrates.* Loewus, F. A.; Tanner, W. eds. Springer-Verlag, Berlín. 763 p.

Kang, Y.; Outlaw Jr.; W.H; Andersen, P.C.; Fiore, G.B. 2007. Guard-cell apoplastic sucrose concentration – a link between leaf photosynthesis and stomatal aperture size in the apoplastic phloem loader *Vicia faba* L. *Plant, Cell and Environment* 30:551-558.

Kaplan, F.; Sung, D.Y.; Guy, Ch.L. 2006. Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum* 126:120-128.

Kawabata, S.; Sasaki, H.; Sakiyama, R. 2005. Role of transpiration from fruits in phloem transport and fruit growth in tomato fruits. *Physiologia Plantarum* 124:371-380.

Kelly, G.J.; Zimmermann, G.; Latzko, E. 1976. Light induced activation of fructose-1,6 biphosphate in isolated intact chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 70:193-199.

Kozlowski, T.T.; Pallardy, S.G. 1997. *Physiology of woody plants.* 2ed. Academic Press, San Diego. Estados Unidos. 411 p.

Kulikova, A.L.; Danilina, T.A.; Dudinskaya, T.V.; Kholodova, V.P. 2009. Actin determination in the conductive and growing plant tissues. *In: Proceedings of the International Symposium on Source-Sink Relationship in Plants. Acta Horticulturae* 835:49-56.

Lawlor, D.W. 1987. Metabolism of photosynthetic products. *In: Photosynthesis: metabolism, control and physiology.* Longman Scientific & Technical Eds. United States. pp. 158-181.

Lee, J.Y.; Cui, W.E. 2009. Non-cell autonomous RNA trafficking and long distance signaling. *Journal of Plant Biology* 52:10-18.

Lu, Y.; Sharkey, T.D. 2006. The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell and Environment* 29:353-366.

Matsubashi, S.; Fujimaki, S.; Kawachi, N.; Ishioka, N.S.; Kume, T. 2005. Quantitative modelling on photoassimilate flow in an intact plant using the Positron Emitting Tracer Imaging system (PETIS). *Soil Science Plant Nutrition* 51:417-423.

Meinzer, F.C.; Saliendra, N.Z.; Crisosto, C.H. 1992. Carbon isotope discrimination and gas exchange in *Coffea arabica* L. during adjustment to different soil moisture regimes. *Australian Journal of Plant Physiology* 19(2):171-184.

Minchin, P.E.H.; Thorpe, M.R. 1993. Sink strength: a misnomer and best forgotten. *Plant Cell and Environment* 16:1039-1040.

Mullendore, D.; Windt, C.; Van, A. H.; Knoblauch, M. 2010. Sieve tube geometry in relation to phloem flow. *Plant Cell* 22:579-593.

Nagele, T.; Henkel, S.; Hormiller, I.; Sauter, T.; Sawodny, O.; Ederer, M.; Heyer, A.G. 2010. Mathematical modeling of the central carbohydrate metabolism in *Arabidopsis* reveals a substantial regulatory influence of vacuolar invertase on whole plant carbon metabolism. *Plant Physiology* 153:260-272.

Ort, D.R.; Long, S.P. 2002. Converting solar energy into crop production. *In: Plants, Genes and Crop Biotechnology*. Chispeels, M.J.; Sadava, D.E. eds. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury. pp 240-269.

Oparka, K.; Duckett, C.; Prior, D.; Fisher, D. 1994. Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 6:759-766.

Outlaw Jr., W.H.; DeVlieghere-He, X. 2001. Transpiration rate - an important factor controlling the sucrose content of the guard cell apoplast of broad bean. *Plant Physiology* 126:1716-1724.

Penning de Vries, F.W.T. 1974. Substrate utilization and respiration in relation to growth and maintenance in higher plants. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 22:40-44.

Penning de Vries, F.W.T. 1975. The cost of maintenance processes in plant cells. *Annals of Botany* 39:77-92.

Peterhansel, Ch.; Maurino, V.G. 2011. Photorespiration redesigned. *Plant Physiology* 155:49-55.

Pierce, J. 1989. Rubisco: mechanisms and their possible constraints on substrate specificity. *Photosynthesis* 8:149-159.

Piñol, M.T.; Palazón, J. 1993. Metabolismo secundario. *In: Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcon-Bieto, J.; Talon, M. Eds. McGRAW-HILL- Interamericana de España. pp 237-284.

Qi, H.; Li, T; Liu, H; Zhang, J. 2006. Change in ^{14}C -soluble sugar involved in the photosynthate translocation pathway of tomato. *Agricultural Sciences in China* 5(3):209-215. <http://journals.ohiolink.edu/ejc/search.cgi>

Ramon, M.; Rolland, F.; Thevelein, J.M.; Van Dijck, P.; Leyman, B. 2007. ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Molecular Biology* 63:195-206.

- Riaño H., N.M.; Arcila P., J.; Jaramillo R., A.; Cháves C., B.** 2004. Acumulación de materia seca y extracción de nutrimentos por *Coffea arabica* L. cv. Colombia en tres localidades de la zona cafetera central. *Cenicafé (Colombia)* 55(4):265-276.
- Roeb, G.WE.; Dautzenberg, M.; Jahnke, S.** 2009. Use of Short-Lived isotopes to study carbon allocation in intact plants. *In: Proceedings of the International Symposium on Source-Sink Relationship in Plants. Acta Horticulturae* 835:57-64.
- Ron'zhina, E.S.** 2009. Source and sink effects of cytokinins in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *In: Proceedings of the International Symposium on Source-Sink Relationship in Plants. Acta Horticulturae* 835:39-48.
- Rutschow, H.L.; Baskin, T.I.; Kramer, E.M.** 2011. Regulation of Solute Flux through Plasmodesmata in the Root Meristem. *Plant Physiology* 155:1817-1826.
- Sasaki, H.; Edo, E.; Uehara, N.; Ishimaru, T.; Kawamitsu, Y.; Suganuma, S.; Ueda, D.; Ohsugi, R.** 2005. Effect of sucrose on activity of starch synthesis enzymes in rice ears in culture. *Physiologia Plantarum* 124:301-310.
- Sengbusch, P.V.** 2007. Botany online: the light reactions of photosynthesis. Disponible en: www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e24/24c.htm. (Consultada, Noviembre de 2011).
- Sharkey, T.D.** 1989. Evaluating the role of *Rubisco* regulation in photosynthesis of C_3 plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. 323:435-448.
- Smith, A.M.; Zeeman, S.C.; Thorneycroft, D.; Smith, S.M.** 2003. Starch mobilization in leaves. *Journal of Experimental Botany* 54 (382):577-583.
- Stitt, M.** 1993. Sink strength: integrated systems need integrating approaches. *Plant Cell and Environment* 16:1041-1043.
- Stryer, L.** 1988. *Biochemistry*. 3 ed. Nueva York (Estados Unidos), W.H Freeman and Company. 1089p.
- Taiz, L.; Zeiger, E.** 2002. *Plant Physiology*. 3ed. Sunderland (Estados Unidos), Sinauer Associates. 690p.
- Terry, N.** 1971. Changes in the distribution of ^{14}C labelled assimilates in sugar beet with variation of temperature. *Journal of Experimental Botany* 22:472-480.
- Thornley, J.H.M.; Cannell, M.G.R.** 2000. Modelling the components of plant respiration: representation and realism. *Annals of Botany* 85:55-67.
- Thorpe, M.R.; Minchin, P.E.H.** 1996. Mechanism of Long-and Short-Distance Transport from Source to Sinks. *In: Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships*. Zamski, E.; Schaffer, A.A. eds. pp. 261-282.
- Tolbert, N.E.** 1997. The C_3 oxidative photosynthetic carbon cycle. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:1-25.

Toldan-Andersen, T.B. 1998. The seasonal distribution of ^{14}C -labelled photosynthates in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Acta Horticulturae* 468:531-540.

Turgeon, R. 1989. The sink-source transition in leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:119-138.

van Iersel, M.W. 2003. Carbon use efficiency depends on growth respiration, maintenance respiration and relative growth rate. A case study with lettuce. *Plant Cell and Environment* 26:1441-1449.

Viator, R.P.; Nuti, R.; Walls, R.; Edmisten, K. 2005. Stem and root carbohydrate dynamics in modern vs obsolete cotton cultivars. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 36:2165-2177.

Waclawovsky, A.J.; Loureiro, M.E.; Freitas, R. do L.; Rocha, C. da S.; Oliva Cano, M.A.; Batista Fontes, E.P. 2006. Evidence for the sucrose-binding protein role in carbohydrates metabolism and transport at early developmental stage. *Physiologia Plantarum* 128:391-404.

Whitney, S.M.; Houtz, R.L.; Alonso, H. 2011. Advancing Our Understanding and Capacity to Engineer Nature's CO_2 -Sequestering enzyme, Rubisco. *Plant Physiology* 155:27-35.

Wilson, D. 1975. Variation in leaf respiration in relation to growth and photosynthesis of *Lolium*. *Annals of Applied Biology* 80:323-338.

Woodrow, L.E.; Berry, J.A. 1988. Enzymatic regulation of photosynthetic CO_2 fixation. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 39:533-594.

Wu, H.; Zheng, X.F. 2003. Ultrastructural studies on the sieve elements in root protophloem of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Botanica Sinica* 45:322-330.

Zambryski, P. 2008. Plasmodesmata. *Current Biology* 18:324-325.

Zamsky, E. 1996. Anatomical and physiological characteristic of sink cells. *In: Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships.* Zamski, E.; Schaffer, A.A. eds. pp. 283-310.

Zhou, R.; Quebedeaux, B. 2003. Changes in Photosynthesis and Carbohydrate metabolism in mature apple leaves in response to whole plant source-sink manipulation. *Journal American Society Horticultural Sciences* 128(1):113-119.

Zhou, Q.; Jiang, D.; Dai, T.; Jing, Q.; Cao, W. 2006. Regulation of starch and protein synthesis in wheat grains by feeding sucrose and glutamine to detached ears cultures *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 48:247-259.

3. Isótopos estables

3.1 Isótopos estables en Eco-Fisiología

El uso de la técnica de isótopos estables en eco-fisiología de plantas ha crecido sustancialmente, tienen la ventaja de ser no radioactivos y son útiles para entender como las plantas responden a factores bióticos y abióticos (Peterson y Fry, 1987; Dawson *et al.*, 2002).

Su uso se ha perfilado como una técnica útil para entender los procesos fisiológicos y las interacciones ambientales en ecología, especialmente en eco-fisiología. Las primeras investigaciones se hicieron en temas bio-geoquímicos. Al avanzar en su entendimiento, ya en los años 70, su principal aplicación en eco-fisiología fue la medición de la relación isotópica ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) para identificar la ruta fotosintética de las especies vegetales, encontrando diferencias que correlacionaron altamente con los metabolismos C_3 , C_4 y MAC (metabolismo ácido de las crasuláceas), convirtiéndose así en una fuerte herramienta para estudios biológicos. Hoy, los isótopos estables se usan para entender diferentes procesos en la fisiología de las plantas como: fijación del nitrógeno, EUA y en última instancia, estudios sobre la relación Fuente-Demanda de carbohidratos y EUC (Ehleringer y Osmond, 1989; Bloch *et al.*, 2006).

3.1.1 Que son los Isótopos

Son átomos de un mismo elemento que, manteniendo sus propiedades químicas, difieren únicamente en el número de neutrones. Cada elemento cuenta con una familia de isótopos radiactivos (inestables) y otros no radiactivos (estables) (Guerrero y Berlanga, 2000); su utilización permite generar información alrededor de los procesos físicos, químicos y metabólicos incluidos en la transformación del carbono, hacia la formación de compuestos en los vegetales.

3.1.1.1 Discriminación isotópica del carbono

El carbono es el elemento más abundante entre los seres vivos e interviene prácticamente en todas las reacciones biológicas. En la naturaleza se presentan dos formas isotópicas estables de carbono: Carbono 12 (^{12}C = 6 protones y 6 neutrones) y Carbono 13 (^{13}C = 6 protones y 7 neutrones), siendo el ^{12}C el isótopo más liviano y más abundante en la atmósfera (98.9 %) y usado principalmente en la fijación del CO_2 fotosintético; el isótopo más pesado (^{13}C) está presente en una proporción del 1.1% e

igualmente es incorporado en los productos fotosintéticos aunque en menor proporción, debido a fenómenos de discriminación isotópica que se dan en los procesos físicos, químicos y biológicos del ciclo del carbono (O'leary, 1981; Farquhar y Richards, 1984; Francey y Tans, 1987; Farquhar *et al.*, 1989; Nogués *et al.*, 2005).

En la fotosíntesis, y debido a la “Discriminación Isotópica” ($\Delta^{13}C$) que ocurre en cada paso del proceso, los isótopos estables del carbono son usados como marcadores de los productos formados, lo que se manifiesta en la “Relación Isotópica” ($\delta^{13}CO_2/^{12}CO_2$) de los tejidos (O'leary, 1981).

El análisis de la $\delta^{13}CO_2/^{12}CO_2$ en las plantas es una herramienta importante para el estudio de los procesos metabólicos y las relaciones Fuente-Demanda; así los carbohidratos, que representan los principales compuestos formados en el metabolismo primario, son enriquecidos con ^{13}C en relación con los ácidos grasos, propios del metabolismo secundario, lo que ofrece una gran oportunidad de investigación del comportamiento metabólico sin la utilización de marcadores radiactivos; además, el contenido isotópico de un metabolito no es distribuido aleatoriamente en las moléculas, más si es determinado por la historia metabólica de su biogénesis (O'leary, 1981).

Según Araus *et al.* (1992), el estudio de la relación isotópica del carbono ($\delta^{13}CO_2/^{12}CO_2$) en los tejidos vegetales, genera información esencial sobre una amplia gama de procesos fisiológicos en la planta, y es especialmente útil como medida integradora de su respuesta a las condiciones ambientales.

La mayor parte de los trabajos con isótopos estables en vegetales se lleva a cabo en las hojas, pues allí se refleja mejor el fraccionamiento fotosintético desde la fijación del carbono hasta la formación del compuesto, donde suceden diversos procesos físicos y químicos; así, se han encontrado diferencias en la $\delta^{13}CO_2/^{12}CO_2$ entre los diversos tejidos de la planta, debidas tanto a su composición química como al período de formación de los diferentes órganos (Araus *et al.*, 1992; Tcherkez *et al.* 2004).

Igualmente, la $\delta^{13}CO_2/^{12}CO_2$ del material orgánico, en el caso de los vegetales, además de discriminar en presencia de luz (fotosíntesis), también lo hace durante la respiración en la oscuridad (González-Meler *et al.*, 2004; Nogués *et al.*, 2005), teniendo en cuenta que el CO_2 que se produce en este proceso corresponde entre un 30-60% al fijado durante la fotosíntesis (Nogués *et al.*, 2004); por lo tanto, la $\delta^{13}CO_2/^{12}CO_2$ durante este proceso afecta el balance global de discriminación y relación isotópica diaria (Griffiths, 2003; Scartazza *et al.*, 2004).

Damesin y Lelarge (2003) sugirieron que las diferencias en $\delta^{13}CO_2/^{12}CO_2$ entre los órganos vegetales se deben fundamentalmente a su composición bioquímica; debido a ello puede haber disminución en el valor de ^{13}C de algunos órganos, lo cual está correlacionado con un elevado contenido de lípidos y ligninas, mientras que un contenido elevado de celulosa correlacionaría con menores valores.

Según Scartazza *et al.* (2004), la diferencia en $\delta^{13}CO_2/^{12}CO_2$ entre dos tejidos es consecuencia de procesos fisiológicos que generan un balance de diferenciación en los diferentes órganos y sus metabolitos componentes. Por ejemplo, aunque una elevada tasa de producción de lípidos conlleva un fraccionamiento elevado de toda la materia seca que estará fuertemente empobrecida en ^{13}C , no podrá ser la causante de la

disminución de ^{13}C en la materia orgánica, pues los átomos de carbono pesados no empleados en la síntesis de lípidos permanecerán en otros componentes del órgano que serán isotópicamente más pesados que la materia orgánica media. Una correlación entre una concentración elevada de compuestos empobrecidos y la materia orgánica empobrecida respecto de la fuente, puede ser el resultado de:

- El fraccionamiento suceda durante la respiración y los átomos de carbono pesado sean respirados preferentemente.
- El carbono exportado proceda de compuestos isotópicamente pesados.
- La carboxilación añada carbono al órgano con un signo isotópico diferente al de los sustratos respirados. Por lo tanto, las diferencias en la composición química no pueden ser la causa de las diferencias correlacionadas en la relación isotópica, sino el resultado de los intercambios de flujo que enriquecen o empobrecen el órgano, según las condiciones.

Badeck *et al.* (2005) estudiaron la relación isotópica de los azúcares en hojas, pecíolo y nervaduras centrales, así como los presentes en el limbo de las hojas y el floema de *Phaseolus vulgaris* L., y no detectaron diferencias significativas entre los diferentes órganos, mientras que Zhu *et al.* (2009) encontraron correlación positiva entre $\delta^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ y el rendimiento en *T. aestivum* L. Una hipótesis sobre este mecanismo fue propuesta por Hobbie y Werner (2004) según la cual los productos fotosintéticos sufren un fraccionamiento en las células foliares; el carbono isotópicamente menos pesado (^{12}C) es preferentemente incorporado a los lípidos y ligninas, el resto de carbohidratos enriquecidos con ^{13}C se emplearían en la síntesis de celulosa; por lo tanto, los carbohidratos exportados en los productos fotosintéticos primarios estarían enriquecidos con ^{13}C y serían exportados principalmente hacia los órganos vertederos.

En general, en la literatura se reporta que los trabajos clásicos sobre la relación Fuente-Demanda, se han desarrollado con ^{14}C como trazador, con todos los riesgos y precauciones que se deben tener con este isótopo radioactivo del Carbono (Guerrero y Berlanga, 2000).

Diversos autores sugieren que el uso de ^{13}C ha sido una metodología útil para seguir las diversas rutas metabólicas en los vegetales (C_3 , C_4 y *MAC*), y otros la recomiendan como mecanismo para dilucidar un tema de alta relevancia para la productividad de los cultivos, como es la relación Fuente-Demanda (Condon y Richards, 1992).

Otros trabajos desarrollados, en especial en *T. aestivum* L. y *H. vulgare* L. han concluido que debido a la alta heredabilidad que presenta la $\Delta^{13}\text{C}$, es una metodología de especial uso en programas de mejoramiento genético, con el fin de estudiar de manera temprana materiales o genotipos más eficientes en la conversión y posterior translocación de los fotoasimilados hacia los órganos de importancia económica, lo cual redundaría en un mejor índice de cosecha (*IC*) (Condon *et al.*, 1987; Hubick *et al.*, 1988; Condon y Richards, 1992; Ehdaie *et al.*, 1991; Acevedo, 1993; Rice, S.K., 2000; Nogués *et al.*, 2006).

En algunos estudios en café se empleó esta metodología para profundizar los estudios fisiológicos y en particular para entender la respuesta de diversos materiales a condiciones de estrés por agua y su respuesta transpiratoria (Hubick *et al.*, 1988; Meinzer *et al.*, 1990, 1992; Griffiths, 1991; Acevedo *et al.*, 1997; Peuke *et al.*, 2006; Nogués *et al.*, 2006; Monti *et al.*, 2006; Voltas *et al.*, 2006; Bloch *et al.*, 2006) con buenos resultados. Otros trabajos han utilizado ésta metodología para determinar el origen geográfico de muestras de café verde procesado (Rodrigues *et al.*, 2009). Para entender la *EUC* a través del estudio de los principales compuestos del metabolismo bioquímico no se encontró ninguno.

3.2 Bibliografía

Acevedo, E. 1993. Potencial of carbon discrimination as a selection criterion in barley breeding. *In: Stable isotopes and plant carbon-water relations.* Ehleringer, J. R.; Hall, A. E.; Farquhar, G. D. eds. Academic press, Inc. United Kingdom. pp. 393-417.

Acevedo, H.E.; Baginsky, G.C.; Solar, R.B.; Cecarrelli, S. 1997. Discriminación isotópica de ^{13}C y su relación con el rendimiento y la eficiencia de transpiración de genotipos locales y mejorados de cebada bajo diferentes condiciones hídricas. *Investigación Agrícola (Chile)* 17 (1 y 2):41-54.

Araus, J.L.; Santiveri P.; Bosch, S.D.; Royo, C.; Romagosa, I. 1992. Carbon isotope ratios in ear parts of triticale. Influence of grain filling. *Plant Physiology* 100:1033-1035.

Badeck, F.W.; Tcherkez, G.; Nogués, S.; Piel, C.; Ghashghaie, J. 2005. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs-a widespread phenomenon. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19:1381-1391.

Bloch, D.; Hoffmann, Ch.M.; Marlander, B. 2006. Impact of water supply on photosynthesis, water use and carbon isotope discrimination of sugar beet genotypes. *European Journal Agronomy* 24:218-225. Disponible online www.sciencedirect.com

Condon, A.G., Richards, R.A.; Farquhar, G.D. 1987. Carbon isotope discrimination is positively correlated with grain yield and dry matter production in field-grown wheat. *Crop Science* 27:996-1001.

Condon, A.G.; Richards, R.A. 1992. Broad sense heritability and genotype x environment interaction for carbon isotope discrimination in field-grown wheat. *Australian Journal Agricultural Research* 43: 921-934.

Damesin, C.; Lelarge, C. 2003. Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant Cell and Environ.* 26:207-219.

Dawson, T.E.; Mambelli, S.; Plamboeck, A.H.; Templer, P.H.; Tu, K.P. 2002. Stable Isotopes in Plant Ecology. *Annual Review Ecology System* 33:507-59. <http://www.jstor.org/stable/3069272>.

Ehdaie, B. A.; Hall, A. E.; Farquhar, G. D.; Nguyen, H. T.; Saines, J. G. 1991. Water use efficiency and carbon isotope discrimination in wheat. *Crop Science* 31:1282-1288.

Ehleringer, J.R.; Osmond, C.B. 1989. Stable isotopes. *In: Plant Physiological Ecology. Field methods and instrumentation.* Pearcy, R.W.; Ehleringer, J.R.; Mooney, H.A.; Rundel, P.W. Eds. Londres (Inglaterra), Chapman and Hall. 457p.

Farquhar, G.D.; Ehleringer, J.R.; Hubick, K.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 40:503-537.

Farquhar, G.D.; Richards, R.A. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11:539-552.

Francey, R.J.; Tans, P.P. 1987. Latitudinal variation in oxygen-18 in atmospheric CO₂. *Nature* 327:495-497.

González-Meler, M.A.; Taneva, L.; Trueman, R.J. 2004. Plant respiration and elevated atmospheric CO₂ concentration: cellular responses and global significance. *Annals of Botany* 94:647-656.

Griffiths, H. 2003. Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C₃ plants. *Photochemical Review* 2:145-161.

Griffiths, H. 1991. Applications of stable isotope technology in physiological ecology. *Functional Ecology* 5 (2):254-269.

Guerrero, R.; Berlanga, M. 2000. Isótopos estables: Fundamento y aplicaciones. Actualidad. Departamento de microbiología, Universidad de Barcelona, España. p 7.

Hobbie, E.A.; Werner, R.A. 2004. Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C₃ and C₄ plants: a review and synthesis. *New Phytologist* 161:371-385.

Hubick, K.T.; Shorter, R.; Farquhar, G.D. 1988. Heritability and genotype x environment interactions of carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Australian Journal of Plant Physiology* 15:799-813.

Meinzer, F.C.; Goldstein, G.; Grantz, D.A. 1990. Carbon isotope discrimination in coffee genotypes grown under limited water supply. *Plant Physiology* 92(1):130-135.

Meinzer, F.C.; Saliendra, N.Z.; Crisosto, C.H. 1992. Carbon isotope discrimination and gas exchange in *Coffea arabica* L. during adjustment to different soil moisture regimes. *Australian Journal of Plant Physiology* 19(2):171-184.

Monti, A.; Brugnoli, E.; Scartazza, A.; Amaducci, M.T. 2006. The effect of transient and continuous drought on yield, photosynthesis and carbon isotope discrimination in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany* 57(6):1253-1262.

Nogués, S.; Tcherkez, G.; Cornic, G.; Ghashghaie, J. 2004. Respiratory carbon metabolism following illumination in intact French bean leaves using $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope labelling. *Plant Physiology* 136:3245-3254.

Nogués, S.; Aranjuelo, I.; Araus, J.L. 2005. Discriminación isotópica del carbono durante la *F* y la respiración. *En: Libro de resúmenes de jornadas técnicas. Nuevas técnicas metodológicas aplicadas al estudio de los sistemas ambientales: Los isótopos estables.* 21 al 25 de Noviembre de 2005. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, España. pp 129-150.

Nogués, S.; Aranjuelo, I.; Araus, J.L. 2006. Discriminación isotópica del carbono durante la fotosíntesis y la respiración. (www.uam.es/centros/ciencias/alumnos/8_Nogues_et_al.pdf. Consultada el 27 de Febrero de 2006).

O'Leary, M.H. 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phyto-chemistry* 20:553-567.

Peterson, B.J.; Fry, B. 1987. Stable Isotopes in Ecosystem Studies. *Annual Review of Ecological System* 18:293-320. Consultada en arjournals.annualreviews.org

Peuke, A.D.; Gessler, A.; Rennenberg, H. 2006. The effect of drought on C and N stable isotopes in different fractions of leaves stems and roots of sensitive and tolerant beech ecotypes. *Plant Cell and Environment* 29:823-835.

Rice, S.K. 2000. Variation in carbon isotope discrimination within and among *Sphagnum* species in a temperate wetland. *Oecologia* 123:1-8.

Rodrigues, C.I.; Maia, R.; Miranda, M.; Ribeirinho, M.; Nogueira, J.M.F.; Máguas, C. 2009. Stable isotope analysis for green coffee bean: A possible method for geographic origin discrimination. *Journal of Food Composition and Analysis* 22:463-471. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfca

Scartazza, A.; Mata, C.; Matteucci, G.; Yakir, D.; Moscatello, S.; Brugnoli, E. 2004. Comparisons of delta C-13 of photosynthetic products and ecosystem respiratory CO₂ and their response to seasonal climate variability. *Oecologia* 140:340-351.

Tcherkez, G.; Farquhar, G.; Badeck, F.; Ghashghaie, J. 2004. Theoretical consideration about carbon isotope distribution in glucose of C₃ plants. *Functional Plant Biology* 31:857-877.

Voltas, J.; Serrano, L.; Hernández, M.; Pemán, J. 2006. Carbon isotope discrimination, gas exchange and stem growth of four Euramerican hybrid poplars under different watering regimes. *New Forests* 31:435-451.

Zhu, L.; Liang, Z.S.; Xu, X.; Li, S.H.; Monneveux, P. 2009. Evidences for the association between carbon isotope discrimination and grain yield-Ash content and stem carbohydrate in spring wheat grown in Ningxia (Northwest China). *Plant Science* 176:758–767. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/plantsci

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Estudiar la relación Fuente - Demanda en el cafeto *Coffea arabica* L.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el momento en el cual la hoja del cafeto *Coffea arabica* L. pasa de importadora a exportadora de asimilados.
- Determinar la influencia de la temperatura sobre la removilización de los asimilados hacia los sitios de demanda en el crecimiento vegetativo del cafeto *Coffea arabica* L.
- Determinar la prioridad y velocidad de movilización de asimilados en la etapa reproductiva del cafeto *Coffea arabica* L.

5. Experimento 1

5.1 Objetivo específico

Determinar el momento en el cual la hoja del cafeto *Coffea arabica* L. pasa de importadora a exportadora de asimilados.

5.2 Revisión de literatura

5.2.1 Transición Demanda a Fuente en hojas

El metabolismo de los carbohidratos cambia sustancialmente durante la ontogenia foliar. Las hojas son heterotróficas en los primeros estados de desarrollo y dependen de los carbohidratos importados desde otras hojas o regiones de la planta. Con el desarrollo pasan gradualmente a ser autotróficas, produciendo asimilados tanto para su mantenimiento como para su exportación, convirtiéndose en los principales órganos de fabricación y envío de asimilados al resto de la planta (Turgeon, 1989; Paul y Pellny, 2003).

El desarrollo de la capacidad fotosintética y el comportamiento Fuente-Demanda de los tejidos, asociado a cambios en las enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, son los dos eventos más importantes en la interacción Fuente-Demanda (Marchi *et al.*, 2005). Al inicio del proceso el CO_2 y P_i son convertidos a TP y luego metabolizados principalmente a sacarosa para ser transportada y utilizada en el desarrollo de los tejidos vertederos. Parte de las TP son retenidas en el cloroplasto y utilizadas en la síntesis de almidón. Hoy se sugiere que la acumulación de este compuesto en el cloroplasto, además de su función de almacenamiento transitorio de energía, es fundamental para el intercambio con P_i y lograr una eficiente producción de ATP por foto-fosforilación, lo cual se traduce en la maximización del proceso fotosintético (Gibson *et al.*, 2011). Cuando el carbono acumulado por F es mayor que el utilizado para R de crecimiento y mantenimiento, el balance neto positivo desencadena su función exportadora (Giaquinta, 1978; Roberts *et al.*, 1999; Marchi *et al.*, 2005).

Los valores máximos de importación de carbono ocurren cuando la hoja tiene alrededor del 10% del área final y se acercan a cero cuando alcanza la mitad o las tres cuartas partes de su máxima capacidad fotosintética (Swanson y Hoddinott, 1978), lo cual depende de la especie, las condiciones ambientales y el estado de desarrollo de la

planta cuando la hoja emerge (Foyer y Galtier, 1996; Taiz y Zeiger, 2002; Paul y Pellny, 2003). En *C. pepo* L. la importación de asimilados disminuyó cuando la superficie foliar fue del 10% de la total, y se convierte en órgano exportador cuando alcanza el 35% del área final (Guardiola y García, 1990). En *B. vulgaris* L. la hoja cambia de demanda a fuente una vez ha desarrollado completamente su aparato fotosintético (Giaquinta, 1978; Schmalstig y Geiger, 1985, 1987). Las hojas de los cítricos no inician la exportación de los asimilados hasta tanto no se encuentren totalmente expandidas (Kriedemann, 1969), necesitando dos o más meses para completar su desarrollo y pasar de demanda a fuente (Schaffer *et al.*, 1987).

En *B. vulgaris* L. la importación se caracterizó por una cantidad de carbono ^{14}C metabolizado hacia proteínas, almidón y carbohidratos estructurales, además de aminoácidos y ácidos orgánicos, a expensas de los componentes solubles. La sacarosa traslocada llega al vertedero y rápidamente es hidrolizada y utilizada para metabolismo y biosíntesis (Giaquinta, 1978).

Al estudiar el paso de demanda a fuente en hojas de melocotón (*Prunus persica* L.), Marchi *et al.* (2005) no encontraron correlación con la posición de la hoja a lo largo del tallo. Así, la primera hoja en exportar fue la número 12 (38-52% de expansión foliar) luego la 16 que tenía más edad. En términos de área foliar efectiva, la transición se obtuvo a los 24, 22 y 30 cm². Similares resultados se encontraron en cerezo (*P. cerasus* L.).

En *C. pepo* se identificó que la transición demanda a fuente es basipétala, la cual estuvo acompañada por un incremento en la tasa de F , desarrollo basipétalo de los espacios intercelulares del mesófilo, de la síntesis de azúcares de transporte y de maduración estructural de las venas menores. El evento crítico sugerido para la transición es la obtención de una presión osmótica suficiente en los elementos cribosos para la carga del floema y la producción de un flujo en masa de solutos para ser exportados (Giaquinta, 1978). Como consecuencia del desarrollo basipétalo, las hojas en crecimiento y desarrollo continúan importando asimilados desde las hojas fuente, por un período de tiempo posterior al inicio de su función exportadora (Turgeon, 1989).

En *Coffea* sp. se han realizado diversos estudios sobre el comportamiento de F foliar, pero son pocos los trabajos que tratan el tema Fuente-Demanda de acuerdo con su edad, ubicación en la rama y estado de desarrollo.

Los primeros estudios sobre la F en hojas de *Coffea* sp. los adelantó Nutman (1937), quien encontró que la tasa de F varió directamente con la RFA cuando era baja, pero disminuyó cuando fue alta. Igualmente encontró máximos valores a plena exposición solar de $2.85 \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, que fueron menores al medio día debido al cierre estomático ocasionado por altos valores de RFA , $T^\circ\text{C}$ y DPV . Las $T^\circ\text{C}$ que superan el óptimo disminuyen la actividad de *Rubisco*, y las que sobrepasan el umbral de tolerancia la desnaturalizan y detienen su actividad (Hernández *et al.*, 1989), así mismo se podría alterar la *EUA* (Farquhar *et al.*, 1988). Por su parte Cannell (1985) encontró en hojas individuales a plena exposición solar tasas máximas de asimilación de $7 \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mientras a la sombra fueron de $14 \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Tio (1962) y Kumar y Tieszen (1980) sugirieron que, contando desde el ápice de la rama, las hojas más activas fotosintéticamente se encuentran entre los pares 4 y 6, es decir, hojas entre 120-180 días de edad aproximadamente.

Por su parte Vélez *et al.* (1993) caracterizaron el comportamiento fotosintético de las variedades Caturra, Colombia, Borbón, Típica, Erecta, Híbrido de Timor, *C. canephora*, *C. congensis*, *C. stenophylla* y progenies triploides, así como la anatomía y la ultra-estructura de las hojas correspondientes a los nudos 1, 4, 7 y 10, de ramas en los tres tercios del árbol. Encontraron diferencias significativas entre los estratos alto, medio y bajo de la planta, tanto para hojas jóvenes como maduras, independientemente de la variedad estudiada. En Caturra, Híbrido de Timor, *C. canephora* y *C. eugenoides* no encontraron dimorfismo entre los cloroplastos del mesófilo y los de las células de la corona del haz vascular, organelos con una estructura granar bien desarrollada, tilacoides en posición centrífuga y gránulos de almidón, características propias de especies con metabolismo C_3 , lo cual significa que el café pertenecería a esta categoría (Cannell, 1985).

López (2004a) evaluó las tasas de intercambio gaseoso en hojas individuales de la variedad Caturra desde su aparición hasta los 90 días de desarrollo, donde abarcó las hojas del primero hasta el sexto nudo. El área foliar alcanzó un valor máximo de 40 cm² a los 60 días, y el punto de inflexión de la curva sigmoide característica del crecimiento se obtuvo a los 35 días luego de la emergencia. La tasa de asimilación de CO₂ estuvo entre 1.97 y 11.22 $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para las hojas entre los 30 y 90 días de desarrollo respectivamente. Si bien el crecimiento y desarrollo de la hoja y la tasa de asimilación de CO₂ describieron un comportamiento sigmoideal con el tiempo, se observó que la edad a la cual se alcanza la máxima lámina foliar, no corresponde con la asimilación máxima de CO₂, la cual se obtiene con posterioridad.

5.3 Materiales y métodos

Se determinó la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) tal como se describe en el numeral 5.3.4.2. Con el fin de integrar el tamaño y la actividad de la fuente y la demanda [área foliar (cm²) y peso seco (g)] al movimiento de ${}^{13}\text{CO}_2$ entre las hojas de acuerdo con su edad (ubicación en los nudos), se ajustó la RI con el Área Foliar Específica [AFE (cm²g⁻¹)] a través del tiempo, para las hojas de los nudos 1 al 6. Igualmente se midieron, para los mismos nudos, las tasas de fotosíntesis (F) y respiración (R), así como la dinámica del metabolismo foliar reflejada en la RI del aire respirado (Ra) por las hojas marcadas del nudo 3, en plantas de *C. arabica* L.

5.3.1 Ubicación

El experimento se llevó a cabo en la sede principal de Cenicafé - Planalto, localizada a los 05°01'N latitud, 75°36'W longitud y 1310 m.s.n.m de altitud (Cordillera Central - Vertiente Occidental), en el municipio de Manizales, Caldas, Colombia, con temperatura mínima promedio anual de 16.6°C, temperatura máxima promedio anual de 26.6°C, temperatura media promedio anual de 20.8°C, precipitación acumulada anual de 2509 mm y humedad relativa promedio anual de 81% (Fedecafé, 2012). El

área pertenece, de acuerdo con la clasificación de Holdridge, a Bosque muy Húmedo Premontano (bmh-P) (Holdridge, 1987).

5.3.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Coffea arabica* L. variedad Castillo El Rosario® progenie CX2178, de 20 meses de edad, sembradas en bolsas de polietileno de 45 cm de altura x 35 cm de diámetro, para un volumen total de 43.295 cm³ de suelo unidad Chinchiná (*Typic Dystrandepts*) de la subestación el Rosario (Cenicafé): pulpa de café descompuesta, en relación volumétrica 3:1, las cuales se mantuvieron a plena exposición solar, bajo adecuadas condiciones de agua y nutrientes.

5.3.3 Metodología de marcación de las hojas con ¹³CO₂

5.3.3.1 Mezcla de gases

Se hizo una mezcla de gases para la marcación con ¹³CO₂ consistente en N₂ proveniente de un cilindro de ultra alta pureza (UAP) (Linde, grado 5, 6.5 m³, 1800 PSI) y Dióxido de Carbono (99% ¹³C, <1% ¹⁸O Pureza; Cambridge Isotope Laboratories Inc.- USA, 5 L). El resultado de la mezcla consistió en un cilindro con 900 PSI, volumen de 2.476 litros de CO₂ marcado (¹³CO₂) a una concentración de 1400 ppm; el volumen de gas, presión final y concentración de CO₂ fueron suficientes para adelantar el marcaje de las plantas. El análisis de los diferentes componentes de la mezcla final de gases, se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un detector selectivo de masas (Agilent 6890 HP/Espectrómetro de Masas 5973 DSM HP) teniendo como patrones CO₂ puro, CO₂ proveniente de un cilindro certificado [700 ppm] y aire ambiental. Las integraciones numéricas se hicieron con el programa *Scientific Data Analysis and Graphing Software (SigmaPlot® 10.0)*. Los resultados se presentan en la tabla 5-1.

Los resultados de la tabla 5-1 muestran, en concordancia con lo reportado en la literatura, que en el aire normal el 98.9% del CO₂ corresponde a ¹²CO₂ y el restante 1.1% a ¹³CO₂. Para el caso del CO₂ puro comercial y el aire de referencia certificado con 700 ppm de CO₂ la composición fue similar. La mezcla preparada muestra que el ¹³CO₂ incrementó su composición hasta el 72.3% en promedio, confirmando que la metodología de mezcla fue exitosa y que el cilindro preparado contenía ¹³CO₂ elevado para las respectivas marcaciones.

Tabla 5-1: Áreas bajo la curva de CO₂ preparado (¹³CO₂) y gases de referencia leídos en el sistema Cromatógrafo de gases/Espectrómetro de masas (CG/EM).

Tipo de Gas	Áreas bajo la curva del espectrograma					% Ión 45 / (44 + 45)
	Repetición	Ión 12	Ión 13	Ión 44	Ión 45	
Aire ambiental	1	54973	0	9620284	107031	1,10
	2	42678	0	7465219	84357	1,11
CO ₂ Puro (Comercial)	1	49271851	571153	4520584723	67795838	1,47
	2	32283615	154314	3054347999	44904476	1,40
700 ppm (Certificado)	1	63685	0	10511814	123783	1,16
	2	65689	0	10727692	122249	1,12
¹³ CO ₂ preparado	1	31119	96041	4958941	14035941	73,89
	2	36674	99198	5926373	14273855	70,66

5.3.4 Desarrollo del experimento

El experimento se adelantó bajo las condiciones de temperatura ($T^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (HR - %) y radiación fotosintéticamente activa [RFA - $\mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] presentes en el ambiente de Cenicafé-Planalto; las dos primeras variables se midieron con un sensor Vaisala *HUMICAP*[®] conectado al sistema *Hydra Logger Fluke* y *Data Acquisition Software*; la RFA se midió con un sensor *Quantum LI-190 LICOR*, conectado al colector de datos *LI-1000 - LICOR*. Las variables se midieron las 24 horas del día durante cuatro días consecutivos.

Se seleccionaron 6 plantas que presentaron 6 ramas con al menos 6 nudos por rama. El área foliar del total de las 36 ramas seleccionadas se midió con la regla desarrollada por Arcila (1987). El par de hojas localizadas en el nudo 3 de 18 ramas (contados desde el ápice de la rama) se introdujeron en bolsas plásticas de 9 cm de ancho y 12 cm de longitud, para un volumen de 760 cm^3 , se sellaron con silicona transparente al pecíolo de la hoja, previa prueba de fugas y se les adicionó aire normal de forma continua durante tres horas para aclimatarlas a tales condiciones. Posteriormente, el aire enriquecido con $^{13}\text{CO}_2$ fluyó continuamente a través de las bolsas unidas con mangueras Masterflex[®] durante 3 horas. El aire enriquecido fluyó inicialmente a una tasa 7 ml min^{-1} , fue mezclado con aire normal y homogeneizado, para luego incorporarlo al sistema de bolsas conectadas y con las hojas dentro (figura 5-1).

El diseño permitió que cada bolsa se inflara al ingresar el aire quedando la hoja libre en ella, y realizar así el proceso de intercambio gaseoso adecuadamente. Las hojas sin marcar consistieron en el mismo número de ramas y plantas sin introducirlas en bolsas.

A las 1.5, 6, 12, 24, 48 y 72 horas posteriores a la marcación, se extrajeron las hojas del nudo 3 de las bolsas y se retiraron las hojas correspondientes a los nudos 1,2 y 4 a 6, en una rama por planta, se llevaron individualmente a nitrógeno líquido y posteriormente a freezer a -70°C hasta su liofilización. Igual procedimiento se adelantó para las hojas no marcadas. De manera simultánea, a las hojas de los nudos 1 a 6 de una rama en una planta seleccionada sin marcar, se les midió el intercambio gaseoso entre las 7 a.m y las 7 p.m. Otras dos plantas seleccionadas una marcada y otra sin marcar, se sometieron a oscuridad permanente y se midió el intercambio gaseoso en las hojas de los seis nudos en las mismas horas anotadas, y en la planta marcada se recolectó una muestra del aire respirado a las 6, 18, 42, 66 y 78 horas posteriores a la marcación y se midió su relación isotópica (RI - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$). El intercambio gaseoso se midió con un equipo portátil *PP System CIRAS-2 (Portable Photosynthesis System)* de sistema abierto.

Para tomar las muestras de aire respirado y medir su RI , se diseñó y construyó una cámara en plexiglás ($24\text{cm} \times 5\text{cm} \times 4\text{cm}$), donde se introdujeron dos hojas del nudo tres previamente marcadas, adheridas a la rama y mantenidas en oscuridad. La cámara sellada de forma hermética tenía un orificio para tomar muestras con jeringa y luego almacenarlas en viales. Una vez tomada la muestra de aire respirado, se pasó aire ambiental libre de CO_2 (atrapado con *Soda Lime*), con el fin de evacuar el remanente de aire respirado de la cámara; cuando el aire al interior de dicha cámara alcanzó el nivel de 0-10 ppm de CO_2 , la cámara fue sellada completamente. Para medir la concentración de CO_2 en el aire, éste se inyectó directamente en el puerto de entrada del analizador infrarrojo *ADC-225 MK3* (figura 5-1).

Figura 5-1: Desarrollo del experimento 1: cilindros de $^{13}\text{CO}_2$ preparado, CO_2 puro y CO_2 certificado, reguladores de presión y válvulas de aguja (A), sistema de mezcla de $^{13}\text{CO}_2$ preparado y aire ambiental (B), disposición de mangueras provenientes de la cámara de mezcla hacia las plantas (C y D), disposición de las hojas en las bolsas y mangueras de entrada y salida del aire (E), medición de $F [\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}]$ en hojas individuales de los nudos 1 al 6 (F), cámara y hojas para medición de relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado (G), medición de $R [\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}]$ en hojas individuales de los nudos 1 al 6 (H), equipo para la medición de la concentración de CO_2 en ppm y modo absoluto (I) y metodología para la toma de muestras de la mezcla $^{13}\text{CO}_2$ preparado-aire ambiental (J).



5.3.4.1 Liofilización de las muestras

Las muestras de hojas marcadas y sin marcar mantenidas a -70°C se liofilizaron en el equipo *Freezer Dry System-Labconco*, que fue programado con una rampa de temperatura de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, de tal forma que pasó de -20°C a 30°C en 48 horas, al cabo de las cuales se determinó su condición anhidra. Se pesaron en balanza analítica *Mettler Toledo AB204-S* y luego se molieron en el equipo *Micro-Feinmühle-Culatti (IKA-Labortechnik)* quedando listas para las determinaciones de *RI*.

5.3.4.2 Relación Isotópica (*RI* - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) del Material Orgánico (*MO*)

100 mg de muestra de hojas liofilizadas se colocaron en cápsulas de estaño (*Tin Foil Cups - LECO*) y se depositaron en el auto-muestreador del analizador elemental *CHN (Truspec® LECO Macro)*. El sistema se basa en el método de Pregl-Dumas, en el cual las muestras son puestas en combustión en presencia de oxígeno puro, y los gases generados en máximo nivel de oxidación son separados y leídos por detectores de infrarrojo y de conductividad. La muestra de gas de combustión excedentaria se condujo directamente mediante una línea de acople a la válvula de trampa de 1 ml de loop del *CG*, inyectándolo directamente. En el *CG*-columna *Carboxen™ 1006 Plot* de Sílica fundida, de 30m x 0.32mm, Supelco ref. 24241-4, se separaron los compuestos constituyentes y cada uno fue entregado al detector selectivo de masas *EM HP 5973 DSM*, donde se midió la abundancia de cada uno de los iones con 12, 13, 44 y 45 *UMAS*. Posteriormente se calculó la *RI* ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$).

Las muestras de aire de *R* y de la mezcla se extrajeron de los viales mediante jeringa semáforo y se inyectaron directamente en el puerto correspondiente del *CG/EM* para la medición de la abundancia de los iones y posterior cálculo de *RI*.

5.3.5 Análisis de la información

Se llevó a cabo un análisis descriptivo de la información. Se integraron las áreas bajo la curva de 4 días de medición de las variables climáticas $T^{\circ}\text{C}$, $HR(\%)$ y $RFA [\mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}]$ y se relacionaron con la respuesta de *F* y *R* para las hojas de los nudos 1 a 6. Se analizó el movimiento de los asimilados entre las hojas de los diferentes nudos en relación con el tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$. Se describieron las variables área foliar (cm^2), peso seco foliar (mg) y área foliar específica ($AFE - \text{cm}^2\text{g}^{-1}$) para cada nudo evaluado. Las integraciones de las áreas bajo la curva para obtener el total diario se realizaron con la subrutina *AREA.XFM* del programa *Scientific Data Analysis and Graphing Software (SigmaPlot® 10.0)*.

5.4 Resultados

5.4.1 Área Foliar (cm^2), Peso Seco Foliar (mg) y Área Foliar Específica ($AFE - \text{cm}^2\text{g}^{-1}$) de los nudos 1 a 6

El área foliar mostró variaciones de acuerdo con la posición de las hojas en el nudo, presentando el mayor valor en el nudo 2, de igual forma el peso foliar fue mayor en las hojas del nudo 2. Al relacionar el área foliar con el peso foliar, que calcula el índice denominado Área Foliar Específica ($AFE - \text{cm}^2\text{g}^{-1}$), se muestra que hay un comportamiento decreciente secuencial del nudo 1 al 6, lo que denota menor espesor de las hojas jóvenes y mayor en las hojas maduras (tabla 5-2).

Tabla 5-2. Área foliar nudo⁻¹ (cm^2), peso seco de hojas nudo⁻¹ (mg) y área foliar específica nudo⁻¹ ($AFE - \text{cm}^2\text{g}^{-1}$), en hojas de *Coffea arabica* L. var. Castillo El Rosario[®] genotipo CX2178, de acuerdo con su posición en el nudo.

Nudo	Área Foliar (cm^2)	Peso Foliar (g)	Área Foliar Específica (cm^2g^{-1})
1	47.5 ± 9.3	0.352 ± 0.119	135.3 ± 22.7
2	95.6 ± 8.7	0.720 ± 0.136	131.9 ± 10.4
3	79.8 ± 10.3	0.658 ± 0.184	126.0 ± 33.3
4	54.9 ± 9.2	0.458 ± 0.131	122.7 ± 30.4
5	47.6 ± 6.4	0.470 ± 0.119	103.0 ± 20.4
6	37.4 ± 6.2	0.434 ± 0.125	86.5 ± 16.9

5.4.2 Comportamiento de la Temperatura ($T^\circ\text{C}$), Humedad Relativa ($HR\%$) y Radiación Fotosintéticamente Activa [$RFA - \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$], durante los días de medición.

En las figuras 5-2A y 5-2B se muestra el comportamiento de la $HR(\%)$, la $T^\circ\text{C}$ y la $RFA [\mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}]$ para los días de medición de las variables de respuesta, relacionadas con el intercambio gaseoso y con la dinámica de la asimilación y movimiento de los asimilados. Con base en esta información, se calcularon los valores integrados diarios para cada una de las variables estudiadas (tabla 5-3).

Figura 5-2: Humedad Relativa ($HR\%$) y Temperatura del aire ($T^\circ\text{C}$) (A) y Radiación Fotosintéticamente Activa [$RFA - \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (B) en el ambiente del sitio de medición, durante 4 días consecutivos.

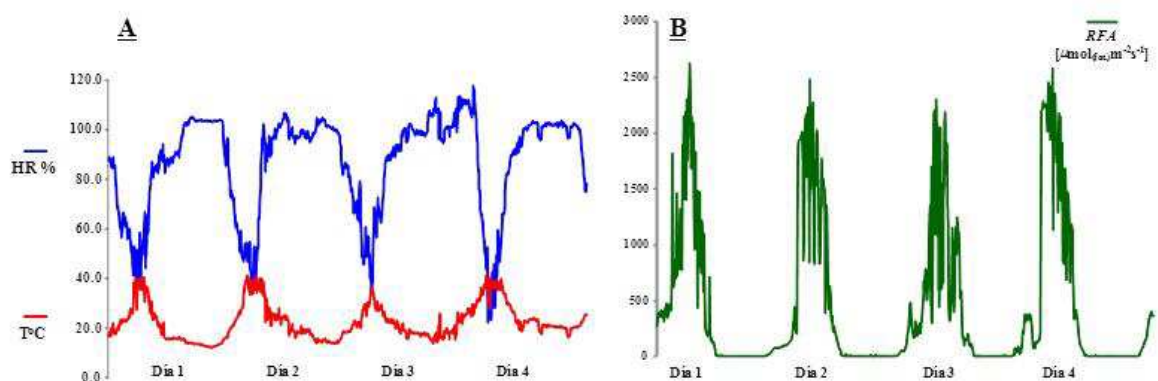


Tabla 5-3: Valores diarios de integración bajo la curva, para los 4 días consecutivos de medición, de las variables ambientales *RFA* [$\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$], Temperatura ($^{\circ}\text{C día}^{-1}$) y Humedad Relativa (unidades porcentuales día^{-1}).

Día	<i>RFA</i> [$\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]	Temperatura ($^{\circ}\text{C día}^{-1}$)	Humedad Relativa (unidades porcentuales día^{-1})
1	30.57	1101293	2492574
2	35.23	1349291	3600214
3	27.50	998272	3713307
4	37.90	1394964	3111023

Los valores diarios integrados muestran diferencias entre días, lo cual indica que para los días con menor *RFA* y $T^{\circ}\text{C}$ se asocia un mayor valor de *HR*, y viceversa, como se muestra para el día 4. Esta oferta energética e hídrica del aire, determina el comportamiento del intercambio gaseoso tanto en su componente fotosintético como respiratorio.

El intercambio diurno foliar de CO_2 se relacionó con la oferta ambiental, de tal forma que valores bajos y medios de *RFA* y $T^{\circ}\text{C}$, favorecen mayores valores de intercambio, en tanto valores superiores afectan la actividad de intercambio de CO_2 (figura 5-3), lo cual ha sido mostrado en varios estudios para esta especie (Gómez *et al.*, 2005). De igual forma, se presentan diferencias en la actividad fotosintética para las hojas en los diferentes nudos y días de medición, presentando menor fotosíntesis neta las hojas correspondientes a los nudos 1 y 6 (tabla 5-4).

En cuanto a la actividad respiratoria nocturna, las hojas de los nudos 2 y 3 presentan los mayores valores, lo cual se asocia con una mayor actividad metabólica relacionada con el transporte y utilización de asimilados (tabla 5-4).

Figura 5-3: Fotosíntesis [$F - \mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] en las hojas de los nudos 1 al 6, de plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, genotipo CX2178. Los números sobre las barras corresponden a los nudos.

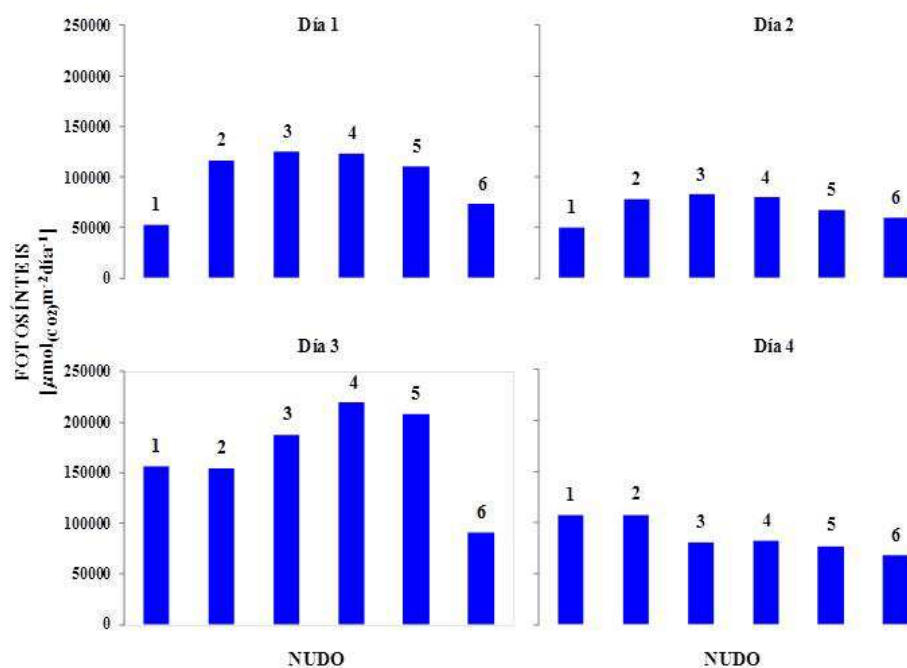


Tabla 5-4: Fotosíntesis y Respiración [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] en las hojas de los nudos 1 al 6, los cuatro días de medición, y la sumatoria de días y nudos en *C. arabica* L. var Castillo® El Rosario, genotipo CX2178.

Nudo	Fotosíntesis [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]				Σ Fotosíntesis [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]	Respiración [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4		
1	52461	50148	156096	107152	365857	24087
2	116298	78030	154656	107800	456784	50634
3	125064	82656	187560	80512	475792	48695
4	123066	80136	219384	82384	504970	23000
5	110196	67356	208224	76840	462616	26178
6	73440	59424	91080	67984	291928	22637
Σ Nudos	600525	417750	1017000	522672		

5.4.3 Relación Isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) de hojas en diferentes nudos, luego de la marcación de la hoja del nudo 3 y sin marcar.

Una vez determinada la actividad fotosintética y respiratoria en cada una de las hojas presentes en los diferentes nudos, se determinó que las hojas del nudo 3 presentaban valores superiores de actividad fotosintética bruta ($F + R$), que presentó valores similares al de las hojas del nudo 4. Por ello se procedió a la marcación de las hojas del nudo 3, para determinar la dinámica de la marcación del tejido foliar y analizar la distribución y movimiento con el trazador ${}^{13}\text{C}$, de tal forma que se llegara a una aproximación que permitiera verificar en que momento una hoja cambia su prioridad de importadora de fotoasimilados a exportadora. Los resultados de la marcación inicial de la hoja del nudo tres y la distribución del trazador en las demás hojas localizadas en nudos diferentes de la misma rama, en diferentes tiempos posterior a la marcación, se presentan en la tabla 5-5. La hoja de este mismo nudo mostró valores de RI , superiores al de las hojas no marcadas, hasta las 48 horas luego del momento inicial, lo cual indica que compuestos del metabolismo primario del carbono, permanecen en su interior, sin ser movilizados ni respirados. Es notable observar que entre el momento de la marcación y las seis horas, las hojas del nudo 1 no se marcaron y solo hasta las 12 horas posteriores a la marcación se evidencia presencia del trazador. De manera contraria, las hojas de los nudos 2 y 4 a 6, aparecen marcadas para el mismo momento de la marcación, pues presentan valores superiores de RI con respecto a las hojas del mismo nudo sin marcar. Para las horas subsiguientes y hasta las 48 horas, se muestra que las hojas de todos los nudos aparecen marcadas, lo que indica una movilización de asimilados y permanencia en los tejidos.

5.4.4 Relación Isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) asociada al Área Foliar Específica ($AFE - \text{cm}^2\text{g}^{-1}$) con el tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$

Puesto que los datos de RI por muestra procesada se obtienen para una misma cantidad de peso seco (0,1g), se ajustó la información para el área foliar expuesta y su peso seco total. La tabla 5-6 muestra los valores de RI corregidos con su AFE (cm^2g^{-1}). Los resultados muestran que el comportamiento es similar para los valores de RI , tanto para la muestra como para los corregidos por el área foliar expuesta. La representación gráfica del comportamiento de la marcación con el trazador ${}^{13}\text{C}$, en las diferentes hojas para diferentes nudos y tiempos de medición (figura 5-4), muestra que únicamente las hojas del nudo 1 y 6 en tiempos iniciales de la marcación del nudo 3 no aparecen

marcadas, y este mismo nudo al cabo de las 72 horas no aparece marcado, lo que indica una removilización de los fotoasimilados hacia otras hojas.

Tabla 5-5: *RI* de muestras de hojas presentes en los nudos 1 al 6 entre las 0 y 72 horas luego de marcar las hojas del nudo 3 y de hojas sin marcar en *C. arabica* L. var Castillo® El Rosario, genotipo CX2178.

Tiempo	Nudos					
	1	2	3	4	5	6
0	0.01766* ± 0.001	0.02813 ± 0.0007	0.03676 ± 0.0002	0.02281 ± 0.0005	0.02012 ± 0.0008	0.01593 ± 0.0012
6	0.01905* ± 0.00004	0.02460 ± 0.0019	0.02070 ± 0.0007	0.02120 ± 0.0009	0.01037* ± 0.0011	0.01523* ± 0.0011
12	0.02680 ± 0.00008	0.01707* ± 0.0007	0.02229 ± 0.0003	0.01989 ± 0.001	0.01863 ± 0.0016	0.01730 ± 0.0003
24	0.02415 ± 0.0003	0.02419 ± 0.0017	0.02118 ± 0.0013	0.02728 ± 0.001	0.01703 ± 0.0013	0.01311* ± 0.0006
48	0.02411 ± 0.0001	0.02240 ± 0.0008	0.02361 ± 0.0006	0.02676 ± 0.0007	0.01712 ± 0.0002	0.01596 ± 0.0006
72	0.02051* ± 0.0002	0.02201 ± 0.0019	0.01932* ± 0.0006	0.02016 ± 0.0017	0.02119 ± 0.0003	0.01586 ± 0.0002
Prom. Marcadas	0.02205 ± 0.0003	0.02305 ± 0.0013	0.02398 ± 0.0006	0.02302 ± 0.001	0.01741 ± 0.0009	0.01556 ± 0.0007
Sin marcar	0.02076 ± 0.0009	0.01956 ± 0.0012	0.02031 ± 0.0013	0.01912 ± 0.0008	0.01659 ± 0.0013	0.01534 ± 0.0009
Diferencia	0.00129	0.00349	0.00367	0.00390	0.00082	0.00022

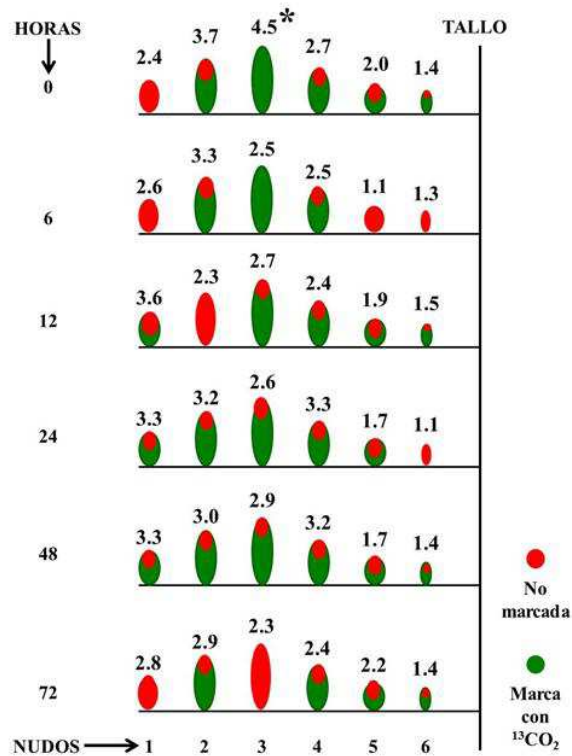
* Valores iguales o inferiores al de hojas sin marcar indican que no hubo marcación.

Tabla 5-6: *RI* del total de área foliar presente por nudo asociada al AFE, entre las 0 y 72 horas luego de marcar las hojas del nudo 3 y de hojas sin marcar en *C. arabica* L. var Castillo® El Rosario, genotipo CX2178.

Tiempo	Nudos					
	1	2	3	4	5	6
0	2.382334* ± 0.176	3.735664 ± 0.954	4.458988 ± 1.05	2.734919 ± 0.459	2.038156 ± 0.402	1.373166 ± 0.301
6	2.569845* ± 0.287	3.266880 ± 0.145	2.510910 ± 0.179	2.541880 ± 0.079	1.050481* ± 0.081	1.312826* ± 0.043
12	3.615320 ± 0.405	2.266896* ± 0.094	2.703777 ± 0.148	2.384811 ± 0.174	1.887219 ± 0.254	1.491260 ± 0.418
24	3.257835 ± 0.156	3.199152 ± 0.458	2.569134 ± 0.288	3.270872 ± 0.630	1.725139 ± 0.142	1.130082* ± 0.441
48	3.252439 ± 0.691	2.974720 ± 0.145	2.863893 ± 0.242	3.208524 ± 0.955	1.734256 ± 0.267	1.375752 ± 0.051
72	2.766799* ± 0.307	2.922928 ± 0.285	2.343516* ± 0.285	2.417218 ± 0.206	2.146547 ± 0.621	1.367132 ± 0.253
Prom. marcadas	2.974095 ± 0.337	3.061040 ± 0.346	2.908369 ± 0.365	2.759704 ± 0.417	1.763633 ± 0.294	1.341703 ± 0.251
Prom. sin marcar	2.800524 ± 0.879	2.597568 ± 0.412	2.463603 ± 1.044	2.292488 ± 0.757	1.680567 ± 0.513	1.322308 ± 0.297

*Valores iguales o inferiores al de hojas sin marcar indican que no hubo marcación.

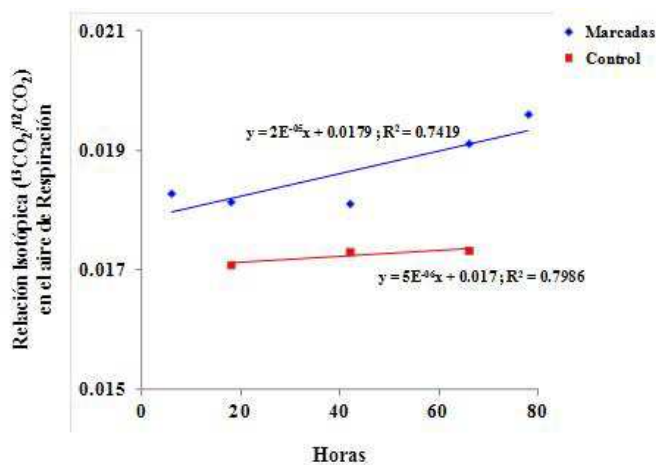
Figura 5-4: Relación entre RI ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)/ AFE (cm^2g^{-1}) en el material orgánico (MO) del total de las hojas de los nudos 1 al 6, para plantas de *C. arabica* L. var. Castillo El Rosario[®] genotipo CX2178, marcadas y control, entre las 0 y 72 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$. Los números asociados a cada nudo corresponden al valor de RI de la hoja.



5.4.5 Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por las hojas marcadas y aire normal

La RI en el aire respirado por las hojas marcadas con $^{13}\text{CO}_2$ del nudo 3, las cuales permanecieron en completa oscuridad durante 78 horas posteriores a la marcación, y de aire ambiental, se muestran en la figura 5-5. En la medida que el tiempo transcurrió, la RI del aire respirado mostró un incremento que se asocia con la tasa del modelo obtenido, lo que indica que hasta el final del experimento aún se encontraba al interior de las hojas parte del $^{13}\text{CO}_2$ absorbido por fotosíntesis, bien para ser respirado o bien para ser enviado a las hojas de los diferentes nudos, a diferencia de lo observado en el aire ambiental, el cual tuvo siempre valores de RI similares y menores que en las marcadas.

Figura 5-5: Descripción de la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por las hojas marcadas del nudo 3 en plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo El Rosario[®] genotipo CX2178, y del aire ambiental, entre las 0 y 72 horas posteriores a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$.



5.5 Discusión

Las oferta ambiental posibilitó el intercambio gaseoso, permitiendo la incorporación del ${}^{13}\text{CO}_2$ desde el aire externo hasta lograr su fijación por la actividad fotosintética en las hojas del nudo 3 inicialmente marcadas, y su removilización a otras hojas de los demás nudos, de acuerdo con los requerimientos fisiológicos de la fuente y la demanda, en plantas de *Coffea arabica* L. variedad Castillo[®] El Rosario genotipo CX2178.

De acuerdo con el estado de desarrollo foliar, las tasas de *IG* respondieron a las condiciones climáticas prevalentes. En *Coffea* sp. es normal que por su origen de semi-sombra los días con oferta energética y térmica moderada, permiten un mejor funcionamiento estomático, lo cual ha sido ampliamente reportado en otros estudios para la misma especie, en las mismas condiciones ambientales donde se llevó a cabo el experimento y con variaciones asociadas con la altitud, que se relacionan con cambios en la oferta térmica, en tanto que incrementos en la temperatura y la radiación afectan negativamente la actividad fotosintética (Nutman, 1937, 1941; López, 2004b; Gómez *et al.*, 2005).

Una hoja joven en el cafeto, que se encuentre entre los 10 y 30 días de desarrollo, se ubica en el primer nudo distal de la rama. Ésta, de acuerdo con Arcila (1983, 2007) y López (2004a), está en su estado inicial de crecimiento y desarrollo, por lo tanto la respuesta en términos fotosintéticos es baja. Su tamaño, así como su coloración verde claro, sugiere que su estructura interna contiene bajo número de cloroplastos y por tanto de nitrógeno que le confiere esa apariencia. Los cloroplastos en plena división y síntesis de novo a partir de plastidios no funcionales impiden tener actividad fotosintética en magnitud suficiente, que garantice el suministro de fotoasimilados para suplir las necesidades para su crecimiento, tal como lo consideran Foyer y Galtier (1996) y Marchi *et al.* (2005) en diferentes especies.

Al observar los resultados de *IG* obtenidos en las hojas de los nudos 2 y 3, las cuales se encontraban entre los 30 y 60 días de emergencia, y de acuerdo con la curva de crecimiento reportada por López (2004a), se considera que éstas se encontraban en la etapa de rápido crecimiento, o etapa lineal de la curva sigmoide, normal para el crecimiento y acumulación de materia seca de los diferentes órganos de *Coffea* sp. (Riaño, 2004).

Por su actividad fotosintética, las hojas correspondientes a los nudos 2 a 4 presentaron las mayores tasas de *F*, lo que indica que han obtenido su madurez funcional, de tal forma que pueden suplir sus necesidades de fotoasimilados, aun cuando varios estudios indican que el carbono puede ser transportado a tejidos fotosintéticos que sean exportadores netos, en caso de necesidad funcional para prevenir daños por fotooxidación y de esa forma convertirse en vertederos temporales (Giaquinta, 1978).

La marcación exitosa de las hojas del nudo 3 con el trazador ^{13}C , y la determinación de su dinámica en la movilización entre hojas de otros nudos y en varios tiempos posteriores al proceso de marcación, permiten determinar en los resultados obtenidos que el límite funcional de una hoja para delimitarla como importadora neta de fuentes carbonadas no es claro, pues aún las hojas inmaduras en estadios iniciales del crecimiento, como las localizadas en el nudo 1, fueron las que más tardaron en presentar el trazador, como indicador de la movilización de los fotoasimilados. Ello mostró que no existe una separación clara entre una hoja fuente o exportadora neta o una hoja demandante, dado que su actividad fotosintética comienza desde el mismo momento de aparición del primordio foliar diferenciado, de tal manera que ya suple parcialmente sus necesidades metabólicas. Ello se corroboró al llevar a cabo el ajuste de los resultados de *RI*, con el área foliar específica, que permitió incorporar al análisis el efecto de la madurez del tejido en función de su área foliar y su peso.

Es interesante analizar el hecho que hojas de los nudos 5 y 6, que de acuerdo con Arcila (1983, 2007) son maduras y se encuentran en una etapa media de duración en la rama, sean importadoras de asimilados, pues aparecen marcadas desde tempranos momentos luego de la marcación, hasta el final del experimento. Esto reitera que no existe un límite funcional en la hoja, que pueda definirla como importadora neta o exportadora neta de asimilados, lo cual es coincidente con los reportado por Marchi *et al.* (2005), quienes en sus estudios en *P. persica* L. no encontraron correlación entre la transición demanda a fuente con la posición de la hoja a lo largo del tallo, es decir, no fue secuencial con base en la emergencia y desarrollo de sus hojas.

Diversos experimentos concluyeron que la transición demanda a fuente en hojas es basipétala, es decir, se presenta desde el extremo de la hoja hacia su base, lo cual está altamente correlacionado con diversos procesos fisiológicos y anatómicos, como un mayor desarrollo de las nervaduras menores (tipo IV y V) en el extremo de la hoja, la disminución de la importación de asimilados en su base (nervaduras mayores tipo I, II y III), la ramificación de los plasmodesmos para facilitar la función de exportación en el extremo foliar y el cierre de los mismos hacia la base de la hoja lo cual evita mayor importación, así como el incremento de la presión osmótica en los elementos cribosos para la carga del floema, que genere un flujo en masa de solutos para ser exportados (Giaquinta, 1978; Turgeon, 1989; Roberts *et al.*, 1999; Marchi *et al.*, 2005).

5.6 Conclusiones

- La metodología de marcación con $^{13}\text{CO}_2$ fue adecuada para seguir el metabolismo en el material orgánico de las hojas de los nudos 1 al 6 en plantas de *Coffea arabica* L. variedad Castillo El Rosario[®] progenie CX2178.
- Con la metodología utilizada y las determinaciones realizadas, no fue posible determinar el límite funcional de la hoja entre su condición de importadora neta de asimilados y exportadora neta de los mismos, puesto que la actividad fotosintética del órgano está asociado con el mismo, desde el momento de su crecimiento a partir del meristemo.

5.7 Bibliografía

Arcila P., J. 1983. El desarrollo foliar del cafeto. Chinchiná (Colombia), Cenicafé. 9 p.

Arcila P, J. 1987. Métodos prácticos para medición del área foliar del cafeto. Diseño de una reglilla para medición del área foliar en el campo. *In*: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé. Chinchiná (Colombia). Informe anual de labores de la Disciplina de Fisiología Vegetal. 1986-1987. Chinchiná, Cenicafé.

Arcila P., J. 2007. Crecimiento y desarrollo de la planta de café. *In*: Sistemas de producción de café en Colombia. Chinchiná (Colombia), Cenicafé-FNC. p. 21-60.

Cannell, M.G.R. 1985. Physiology of the coffee crop. *In*: Clifford, M.N.; Willson, K.C. eds. Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage. West port, AVI Publishing Company. p. 108-134.

Farquhar, G.D.; Hubick, K.T.; Condon, A.G. and Richards, R.A. 1988. Carbon isotope fractionation and plant water use efficiency. *In*: Rundel, P.W.; Ehleringer, J.R.; Nagy, K.A. Stable isotopes in ecological research. New York, Springer-Verlag. p. 21-40.

Fedecafé. 2012. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Disciplina de Agroclimatología, Archivos Climáticos, Chinchiná, Caldas, Colombia.

Foyer, C.H.; Galtier, N. 1996. Source-Sink interaction and communication in leaves. *In*: Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships. Zamski, E.; Schaffer, A.A. eds. pp. 311-340.

Giaquinta, R. 1978. Source and sink leaf metabolism in relation to phloem translocation. Carbon partitioning and enzymology. *Plant Physiology* 61:380-385.

Gibson, K.; Park, J.; Naga, Y.; Hang, S.; Cho, Y.; Roh, K.; Lee, S.; Kim, D.; Choi, S.; Ito, H.; Edwards, G.E.; Okita, T.W. 2011. Exploiting leaf starch synthesis as a transient sink to elevate photosynthesis, plant productivity and yields. *Plant Science* 181:275–281. Consulta en internet: www.elsevier.com/locate/plantsci

Gómez G., L.F.; López R., J.C.; Riaño H., N.M.; López F., Y.; Montoya R., E.C. 2005. Diurnal changes in leaf gas exchange and validation of a mathematical model for coffee (*Coffea Arabica* L.) canopy photosynthesis. *Photosynthetica* (Checoslovaquia) 43(4):575-582.

Guardiola, J.L.; García, L.A. 1990. Fisiología Vegetal 1: Nutrición y Transporte. Madrid (España), Editorial Síntesis. 440 p.

Hernández, A. del P.; Cock, J.H.; El-Sharkawy, M.A. 1989. The response of leaf gas exchange and stomatal conductance to air humidity in shade-grown coffee, tea and cacao plants as compared with sunflower. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal* 2:155-161.

Holdridge, L.R. 1987. Ecología basada en zonas de vida. San José (Costa Rica), IICA. 216 p.

Kriedemann, P.E. 1969. ^{14}C distribution in lemon plants. *Journal of Horticultural Science* 44: 273-279.

Kumar, D.; Tieszen, L.L. 1980. Photosynthesis in *Coffea arabica* L. I: Effects of light and temperature. *Experimental Agriculture* 16:21-27.

López R., J.C. 2004a. Estudio de la relación entre el desarrollo foliar y el intercambio gaseoso de la hoja individual de *Coffea arabica* L. cv. Caturra. In: Centro Nacional de Investigaciones de Café Cenicafé. Chinchiná. Colombia. Informe anual de labores de la Disciplina de Fisiología Vegetal. Noviembre de 2003-Octubre de 2004.

López R., J.C. 2004b. Comportamiento del intercambio gaseoso de *Coffea arabica* L. en tres altitudes de la zona cafetera central colombiana. *Cenicafé* (Colombia) 55(3):202-212.

Marchi, S.; Sebastiani, L.; Gucci, R.; Tognetti, R. 2005. Sink-source transition in peach leaves during shoot development. *Journal of American Society Horticultural Sciences* 130(6):928-935.

Nutman, F.J. 1937. Studies on the physiology of *Coffea arabica*. I: Photosynthesis of coffee leaves under natural conditions. *Annals of Botany* 3:353-367.

Nutman, F.J. 1941. Studies of the physiology of *Coffea arabica* L. III: Transpiration rates of whole trees in relation to natural environmental conditions. *Annals of Botany* 5:59-81.

Paul, M.J.; Pellny, T.K. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* 54 (382): 539-547.

Riaño H., N.M.; Arcila P., J.; Jaramillo R., A.; Cháves C., B. 2004. Acumulación de materia seca y extracción de nutrimentos por *Coffea arabica* L. cv. Colombia en tres localidades de la zona cafetera central. *Cenicafé* (Colombia) 55(4):265-276.

Roberts, A.G.; Santa Cruz, S.; Boevink, P.; Roberts, I.M.; Sauer, N.; Oparka, K.J. 1999. The sink-source transition in leaves - New insights. Plant molecular and cell biology. <http://www.scri.ac.uk/scri/file/individualreports/1999/08SINKSO.PDF>. Consultada en Mayo de 2012.

Schmalstig, J. G.; Geiger, D.R. 1985. Phloem unloading in developing leaves of sugar beet. I. Evidence for pathway through the symplast. Plant Physiology 79: 237-241.

Schmalstig, J. G.; Geiger, D.R. 1987. Phloem unloading in developing leaves of sugar beet. II. Termination of phloem unloading. Plant Physiology 83: 49 -52.

Schaffer, A.A.; Sagee, O.; Goldsmidt, E.E.; Goren, R. 1987. Invertase and sucrosa synthase activity, carbohydrate status and endogenous IAA levels during *Citrus* leaf development. Physiologia Plantarum 69: 151-155.

Swanson, C.A.; Hoddinott, J. 1978. Effect of light and ontogenic stage on sink strength in bean leaves. Plant physiology 62:454-457.

Taiz, L.; Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. 3ed. Sunderland (Estados Unidos), Sinauer Associates. 690p.

Tio, M.A. 1962. Effect of light intensity on the rate of apparent photosynthesis in coffee leaves. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 46:159-166.

Turgeon, R. 1989. The sink-source transition in leaves. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology. 40:119-138.

Vélez A., B.E.; Riaño H., N.M.; Arcila P., J. 1993. Estudio de la anatomía foliar y ultra-estructura del cloroplasto en café. In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Control de Malezas y Fisiología Vegetal, 23. Santafé de Bogotá (Colombia), Febrero 24-26. Bogotá (Colombia), COMALFI. p. 4.

6. Experimento 2

6.1 Objetivo específico

Determinar la influencia de la temperatura sobre la removilización de los asimilados hacia los sitios de demanda en el crecimiento vegetativo del cafeto *Coffea arabica* L.

6.2 Revisión de literatura

6.2.1 Temperatura ($T^{\circ}C$)

La $T^{\circ}C$ es el principal factor ambiental que determina la distribución de las plantas en la superficie terrestre. Esta afecta todos los procesos en los vegetales, desde las reacciones enzimáticas y el transporte transmembranal, hasta los procesos físicos como la transpiración y la volatilización de compuestos específicos. Las diferentes especies difieren en la activación energética de reacciones particulares, y en consecuencia, en la respuesta de la mayoría de procesos fisiológicos a la $T^{\circ}C$, como F , R , fotorespiración, biosíntesis etc. Así, la estabilidad térmica de las principales rutas metabólicas en los vegetales es un determinante fundamental en su rendimiento productivo (Taiz y Zeiger, 2002).

6.2.1.1 Efectos de altas y bajas temperaturas sobre el metabolismo vegetal

Incrementos moderados de la $T^{\circ}C$ del aire y foliar en plantas con metabolismo C_3 influyen poco en la fotólisis del agua y en la difusión del CO_2 , aunque sí en las reacciones bioquímicas de fijación y reducción. Temperaturas superiores suelen aumentar las tasas de F hasta comenzar la desnaturalización enzimática, la destrucción de los $PSII$ y PSI y presentar mayores tasas de R y fotorespiración que especies C_4 y MAC . Con $T^{\circ}C$ elevadas no se produce suficiente ATP y $NADPH$ que permita incrementar la fijación de CO_2 , por lo que la formación de $RuBP$ se vuelve limitante (Lambers *et al.*, 1998).

En todas las especies vegetales la F se asocia con la $T^{\circ}C$ hasta alcanzar un óptimo. A $T^{\circ}C$ superiores al óptimo, la relación CO_2/O_2 disminuye mostrando una menor eficiencia de carboxilación y mayor oxigenación de *Rubisco*, lo que incrementa la función fotorespiratoria (Lambers *et al.*, 1998).

La $T^{\circ}\text{C}$ a la cual las enzimas *Rubisco*, *G3PD* y *PEPC* comienzan a perder actividad y a desnaturizarse es mayor que aquella a la cual empieza a afectarse la *F*, lo que sugiere que éste proceso se relaciona más con las propiedades físicas de las membranas y el desacople de los mecanismos de transferencia de energía en el *PSII*, que por una desnaturalización y pérdida de actividad enzimática (Bjorkman *et al.*, 1980; Lambers *et al.*, 1998).

En cuanto a la *R*, a $T^{\circ}\text{C}$ entre 5°C - 30°C aumenta exponencialmente. En éste rango por cada aumento de 10°C la *R* se duplica, típico de las reacciones enzimáticas, con un Q_{10} aproximadamente de 2. Sobre los 30°C el Q_{10} disminuye ya que la disponibilidad de sustrato y *ATP* no mantiene la alta tasa exigida, la solubilidad del O_2 es menor y la tasa de difusión no aumenta lo suficiente para compensarlo. Si la $T^{\circ}\text{C}$ se aproxima a 50°C - 60°C hay desnaturalización enzimática, y la funcionalidad y estructura de las membranas celulares hace que la *R* cese (Lambers *et al.*, 1998; Larcher, 2003).

Diversos autores han reportado pérdidas elevadas de CO_2 por *R* como consecuencia de altas $T^{\circ}\text{C}$. Hopkins y Hüner (2004) estimaron valores entre el 30%-60% en promedio con valores hasta del 82%, mientras que Atkin y Tjoelker (2003) sugirieron valores del 60% en bosques tropicales (Hopkins y Hüner, 2004).

No obstante la afectación que sufren las plantas por condiciones de $T^{\circ}\text{C}$ adversas, se puede generar un proceso de aclimatación producto de cambios en la concentración de sustrato, es decir, acumulación de azúcares en respuesta al frío, reemplazo de enzimas por isoenzimas con la misma acción pero diferente $T^{\circ}\text{C}$ óptima o alteraciones químicas y estructurales en las biomembranas (aclimatación modulativa a la $T^{\circ}\text{C}$) que ocurre en pocos días o a veces horas, y que asegura que la *F* y la *R* sean ajustadas a la $T^{\circ}\text{C}$ del hábitat (Covey-Crump *et al.*, 2002).

Estudios genéticos en *S. tuberosum* L. y *A. thaliana* L. Heynh. mostraron que la β -amilasa juega un papel clave en la degradación del almidón, como respuesta de tolerancia al estrés por frío, al incrementar la maltosa y otros azúcares solubles que pueden actuar como solutos compatibles, aunque los mecanismos bioquímicos de ésta contribución aún no son claros (Yano *et al.*, 2005; Kaplan *et al.*, 2006). Por el contrario Venema *et al.* (1999), Strand *et al.* (1999) y Lu y Sharkey (2006) sugieren que bajas $T^{\circ}\text{C}$ causan su síntesis. En trabajos *in vitro*, Kaplan y Guy (2004) y Lu y Sharkey (2006) mostraron que la maltosa permite mantener las proteínas, membranas celulares y la cadena de transporte electrónico fotosintético en condiciones fisiológicas normales cuando se someten a estrés por altas o bajas $T^{\circ}\text{C}$.

Otro metabolito sintetizado y relacionado como respuesta a estrés por $T^{\circ}\text{C}$ es el isopreno (hidrocarburo de baja masa molecular), el cual cuando la $T^{\circ}\text{C}$ foliar se eleva, se constituye en una ruta efectiva para mantener su regulación y así mantener intactas las propiedades de las membranas. Su presencia es similar al cambio que se da en el ciclo de las xantofilas, que sugiere una acción protectora contra altos niveles de calor, así como su incremento por elevada *RFA*, sin afectar las tasas de *F* (Lambers *et al.*, 1998).

El estudio del metabolismo usando RI ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) mostró que el CO_2 liberado provino del TCA , en lugar de otros ciclos oxidativos como la ruta de las pentosas fosfato. Atkin y Tjoelker (2003) reportaron que el 27% del CO_2 respirado proviene de ésta ruta y 9% de la síntesis de ácidos grasos, y de la misma forma Williams *et al.* (2010) determinaron que el CO_2 proveniente de ésta última correlacionó con la disminución en la tasa de crecimiento.

En *Coffea* sp. varios estudios mostraron que RFA y $T^\circ C$ moderadas favorecen la actividad fotosintética, en tanto que valores extremos superiores de $T^\circ C$ conducen al cierre estomático afectando la F (Nutman, 1937a, b, 1941; Tio, 1962; Heath y Orchard, 1957). Experimentos bajo condiciones controladas encontraron que al aumentar la RFA sin cambios en la $T^\circ C$ foliar, no afectaron la actividad de F (Decker y Tio, 1959; Tio, 1962; Nunes *et al.*, 1968; Kumar y Tieszen, 1980a; Sambongi *et al.*, 1986). Sin embargo, Decker y Tio (1959) sometieron hojas de café a repetidos ciclos de luz-oscuridad para observar su efecto sobre F y R ; encontraron que la fotorespiración compitió con la F y sólo hubo una pequeña ganancia neta de CO_2 para el incremento en peso seco. Este trabajo describió por primera vez el proceso de fotorespiración en los vegetales (Zelitch, 1971).

Las $T^\circ C$ funcionales óptimas para el cafeto varían de acuerdo con el genotipo, siendo *Robusta* menos adaptable a bajas $T^\circ C$ que la especie *Arabica* (Alégre, 1959; DaMatta *et al.*, 2008). De igual forma, el déficit hídrico y altas $T^\circ C$ afectan la incorporación del CO_2 y modifican la EUA (Meinzer *et al.*, 1990; Gómez *et al.*, 2005). Para una de las variedades de mayor uso en Colombia (*C. arabica* var. Colombia), la F máxima se presentó en el rango de los 25°C - 27°C en hojas individuales y plantas completas (Gómez *et al.*, 2005).

6.3 Materiales y métodos

Se determinó la influencia de la temperatura del aire sobre la Relación Isotópica (RI), la fotosíntesis (F), la respiración (R) y algunos componentes del metabolismo primario del carbono [almidón, azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa), lípidos, proteínas, celulosa y material orgánico (MO)], en plantas de *Coffea arabica* L., para órganos fuente y demanda de fotoasimilados.

6.3.1 Ubicación

El experimento se llevó a cabo en la sede principal de Cenicafé - Planalto, localizada a los $05^\circ 01' \text{N}$ latitud, $75^\circ 36' \text{W}$ longitud y 1310 m.s.n.m de altitud (Cordillera Central - Vertiente Occidental), en el municipio de Manizales, Caldas, Colombia, con $T^\circ C$ mínima promedio anual de 16.6°C , $T^\circ C$ máxima promedio anual de 26.6°C , $T^\circ C$ media promedio anual de 20.8°C , precipitación acumulada anual de 2509 mm y humedad relativa promedio anual de 81% (Fedecafé, 2012). El área pertenece, de acuerdo con la clasificación de Holdridge, a Bosque muy Húmedo Premontano (bmh-P) (Holdridge, 1987).

6.3.2 Material vegetal

Semillas de *C. arabica* L. variedad Castillo El Rosario[®], progenies CX2178 y BH1247, se colocaron a germinar en bandejas que contenían arena de río lavada y desinfectada. A los 60 días, cuando las plántulas presentaron sus hojas cotiledonales plenamente desarrolladas, se trasplantaron a bolsas de polietileno negro de 17cm de diámetro y 23cm de altura, que contenían suelo unidad Chinchiná (*Typic Dystrandepts*) de la subestación el Rosario (Cenicafé): pulpa de café descompuesta en relación volumétrica 3:1, y se mantuvieron a plena exposición solar, bajo adecuadas condiciones de agua y nutrientes.

6.3.3 Desarrollo del experimento

El experimento se adelantó en condiciones de cámara de crecimiento (fitotrón), el cual permitió mantener las condiciones de $T^{\circ}\text{C}$ de acuerdo con el tratamiento aplicado de 13-15 $^{\circ}\text{C}$, 24-26 $^{\circ}\text{C}$ y 34-36 $^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 12 horas, RFA entre 180-200 $\mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y HR (%) variable de acuerdo con la $T^{\circ}\text{C}$. A 44 plantas (22 de cada progenie), se les midió el área foliar con la regla desarrollada por Arcila (1987) y se mantuvieron por dos días en condiciones de aclimatación para cada rango de $T^{\circ}\text{C}$ dentro del fitotrón. Las plantas se introdujeron en bolsas plásticas de 16 litros, se hizo pasar aire normal y se sellaron herméticamente. A 22 plantas (11 de cada genotipo), se les inyectó 10 ml de gas del cilindro preparado con $^{13}\text{CO}_2$ (en adelante marcadas) a un flujo de 10 ml min^{-1} , lo que incrementó la concentración de CO_2 hasta 700-800 ppm. La marcación se llevó a cabo en tres momentos: $t = 0$, $t = 1,5$ horas y $t = 3,0$ horas. Una vez terminada la marcación se retiraron las bolsas, dejando solamente sellado el suelo. Luego, a las 1,5, 24 y 48 horas posteriores a la última marcación, se extrajeron 6 plantas (3 de cada genotipo), se separaron sus órganos y se llevaron a nitrógeno líquido y luego a freezer -70 $^{\circ}\text{C}$ hasta su liofilización.

A otro grupo de 22 plantas (11 de cada genotipo) se les inyectó CO_2 puro sin marcar, incrementando la concentración hasta 700-800 ppm, en los mismos tres momentos. La recolección y tratamiento de las muestras fue similar a la descrita para las plantas marcadas.

Una planta de cada genotipo y tratamiento, se mantuvieron en las bolsas y se conectaron al sistema de medición de intercambio gaseoso, tal como lo describen Gómez *et al.* (2005). Las cuatro plantas restantes se mantuvieron en las bolsas y se cubrieron con bolsas negras de manera permanente hasta 66 horas luego de la última marcación.

6.3.4.1 Medición del intercambio gaseoso (IG)

En general el sistema de medición de intercambio gaseoso consta de un compresor Westinghouse Life-line[®]T de 7.5 HP, un tanque pulmón de 600 L de capacidad, líneas de conducción del aire, un selector de canales ADC-GHU (Analytical development Co. Hoddesdon-Hertz, UK), analizadores infrarojo de gases para CO_2 y H_2O (ADC-225 MK3) que miden la concentración de cada uno de ellos en ppm y mb respectivamente. Sensores adicionales de $T^{\circ}\text{C}$ (PT100) y HR (Vaisala Humicap[®]) se conectaron a un

sistema de captura de datos (*Hydra Logger Fluke*), que permitió mediante el programa *Data Acquisition Software* la visualización de los datos en tiempo real y su almacenamiento en un *PC* vía puerto serial *RS-232* mediante el programa *Trend Link for Fluke*. Las mediciones de *RFA* se realizaron con un sensor Quantum (*Licor Inc*) conectado a un datalogger *LI-1000* para luego ser transferida al *PC*. Las bases de datos se arreglan en una hoja de cálculo *MS-Excel*, analizándolos luego con los paquetes estadísticos *SAS* (*SAS Institute*) y *Scientific Data Analysis and Graphing Software* (*SigmaPlot*® 10.0).

Las mediciones de *IG* en las plantas completas, para cada $T^{\circ}\text{C}$ y tratamiento, se hizo durante 72 horas continuas. Para las plantas cubiertas con bolsas negras, las primeras muestras se tomaron a las 18 horas de marcación y luego cada 12 hasta las 66 horas. Mediante jeringa se extrajo una muestra del aire respirado y se almacenó en viales al vacío para su posterior análisis. Inmediatamente, se evacuó la totalidad del aire de la bolsa y se llenó de nuevo con aire normal. La figura 6-1 muestra secuencialmente las actividades realizadas.

6.3.4.2 Total de material vegetal evaluado

Cada $T^{\circ}\text{C}$ tuvo 2 tratamientos, uno para plantas marcadas y otro para plantas control sin marcar. Luego de la marcación se llevó a cabo el muestreo destructivo del material vegetal a las 0, 24 y 48 horas (se consideró tiempo 0 aproximadamente 1,5 horas posterior a la marcación) a 3 plantas por tratamiento (repeticiones), para un total de 36 plantas evaluadas para cada $T^{\circ}\text{C}$ (2 genotipos * 2 tratamientos * 3 repeticiones * 3 horas evaluadas) y un total de 108 plantas evaluadas para *RI* al final del experimento. Adicionalmente un total de 24 plantas para intercambio gaseoso y aire de respiración.

Figura 6-1: Imágenes que ilustran el desarrollo del experimento 2: fitotrón (A), medición del área foliar (B), disposición de la planta en la bolsa (C), disposición del material vegetal en el fitotrón (D), ingreso de $^{13}\text{CO}_2$ o CO_2 puro a la cámara de plástico (E), sistema de medición de *IG* (*F* y *R*) en plantas completas (primer plano), al fondo plantas en total oscuridad (F), disposición del material vegetal posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ durante el día (G), plantas en el fitotrón en la noche y medición de respiración en plantas completas (derecha) (H).



6.3.4.3 Liofilización de las muestras

Las muestras se liofilizaron en cajas de petri en el equipo *Freezer Dry System-Labconco*, programado con una rampa de $T^{\circ}\text{C}$ de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, de tal forma que pasó de -20°C a 30°C en 36 horas, momento en que se determinó su condición anhidra. Inmediatamente se procedió a pesarlas y se molieron en el equipo *Micro-Feinmühle-Culatti (IKA-Labortechnik)*, quedando listas para las siguientes determinaciones:

6.3.4.3.1 Relación isotópica (*RI*) del Material Orgánico (*MO*)

Estas determinaciones se hicieron bajo las mismas condiciones descritas en el experimento 1.

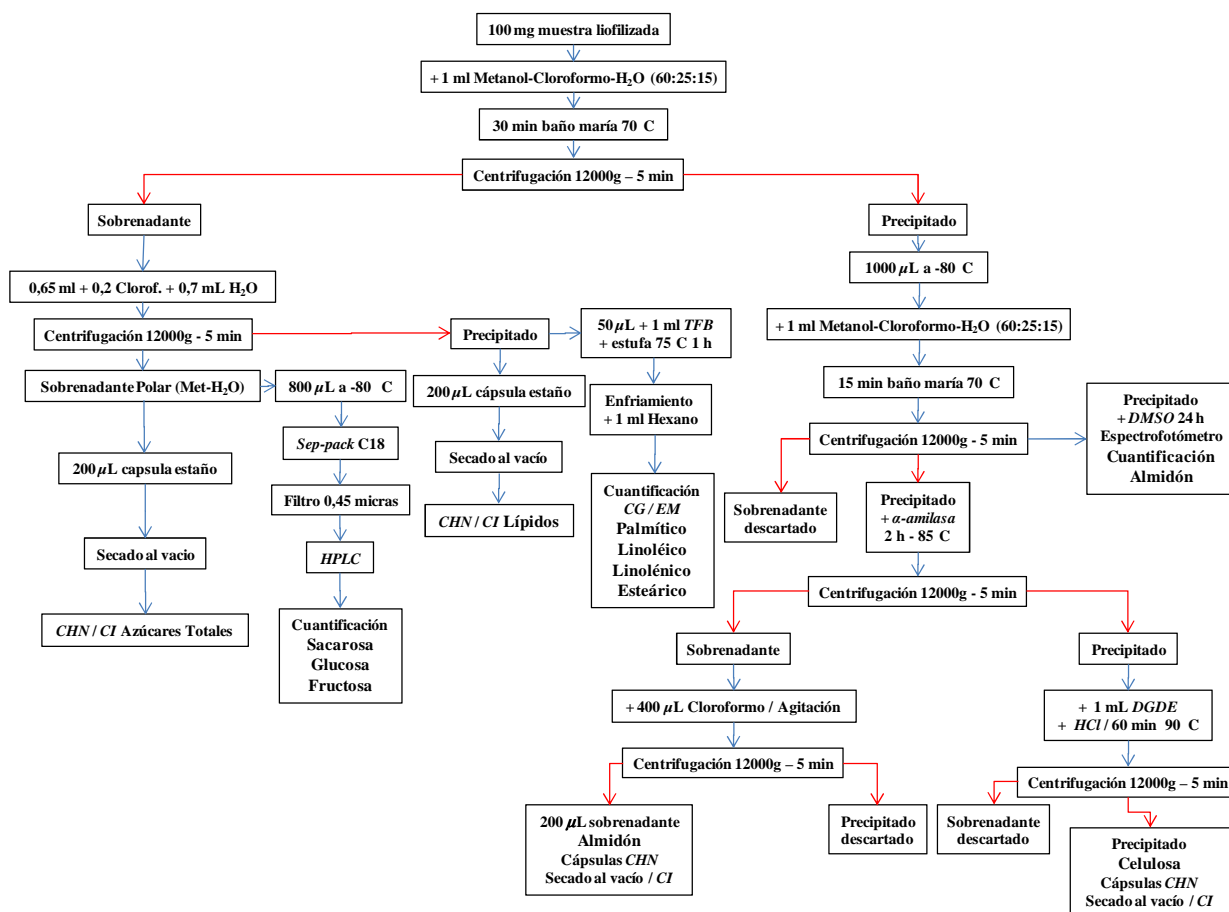
Las muestras del aire respirado por las plantas completas en las bolsas negras se extrajeron de los viales mediante jeringa semáforo y se inyectaron directamente en el puerto de inyección del *CG-EM* para la medición de la abundancia de los iones y *RI*, como se indicó anteriormente.

6.3.4.3.2 Cuantificación y relación isotópica (*RI*) de los productos del metabolismo del carbono

Muestras de cada uno de los órganos en los genotipos y tratamientos aplicados se procesaron con el fin de cuantificar los productos del metabolismo del carbono y la *RI*. Para las hojas se cuantificó el almidón, los azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa), los lípidos (ácidos palmítico, linoléico, linolénico y esteárico), las proteínas totales y la celulosa. Para el tallo y la raíz se cuantificaron los almidones y los azúcares. La *RI* se calculó para los almidones, azúcares, lípidos, proteínas y celulosa totales en las hojas, y para almidones y azúcares en el tallo y la raíz.

La metodología de procesamiento y extracción de los almidones, azúcares totales, lípidos y celulosa fue similar en todos los casos, siguiendo el protocolo descrito por Wanek *et al.* (2001) con los respectivos ajustes y adaptaciones (figura 6-2).

Figura 6-2: Metodología de procesamiento, extracción, cuantificación y determinación de la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$).



100 mg de la muestra liofilizada se llevaron a tubos de reacción de 2 ml con tapa rosca, se les adicionó 1 ml de Metanol:Cloroformo:Agua ($M:C:A$) (60:25:15) y se incubaron por 30 min al baño maría a 70°C, se enfriaron al ambiente y se centrifugaron a 12000g durante 5 min (centrífuga *Eppendorf 5418*).

6.3.4.3.2.1 Cuantificación de los azúcares y RI

A 0.65 ml del sobrenadante se les adicionó 0.2 ml de cloroformo y 0.7 ml de agua, se centrifugó a 12000g por 5 min; de la fase superior (metanol y agua) se llevaron 200µL a cápsulas de estaño, se secaron al vacío y se determinó la RI de los azúcares totales como se describió anteriormente.

El volumen restante del sobrenadante polar se almacenó a -80°C. Los azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructosa) se determinaron por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) empleando un sistema modular (*Waters HPLC*) equipado con una bomba (*Waters 600E*), un detector de IR (*Modelo 2175*) y una columna *Shodex 1011*. El volumen de inyección fue de 20µL y las muestras fueron eluidas con ácido sulfúrico al 0.01 M a un flujo de 0.8 mL min⁻¹ y 25°C y un tiempo de corrida de 20 minutos. Los azúcares fueron identificados y cuantificados por comparación de los

tiempos de retención con sus respectivos patrones y la integración de los picos se llevó a cabo en hoja de cálculo *Excel*[®] para su posterior análisis.

6.3.4.3.2.2 Cuantificación de los lípidos y *RI*

De la fase no polar precipitada se llevaron 200 μL a cápsulas de estaño, se secaron al vacío y se determinó la *RI* de los lípidos totales como se describió con anterioridad; 50 μL del volumen restante se colocaron en viales transparentes, se adicionó 1 ml de trifluoruro de boro (*TFB* - BF_3) y se llevó a estufa a 70°C - 75°C durante 1 hora, se dejaron enfriar y se les adicionó 1 ml de hexano (C_6H_{14}), se llevaron a nevera a -20°C y se almacenaron hasta su cuantificación en el *CG-EM*.

Se utilizó una columna HP-MS, 5% phenylmethylsiloxane, 30m x 250 μm x 0,25 μm . El horno se programó a $20^\circ\text{C min}^{-1}$ de 90°C a 260°C , detector *MSD* a 300°C , gas de arrastre Helio 1,2mL min^{-1} a flujo constante y una inyección de 1 μL , split 70:1 a 300°C . La identificación de cada componente del perfil de ácidos grasos se realizó mediante comparación de los espectros de masas de los componentes eluidos de la columna cromatográfica, con los espectros de masas de la Librería Wiley. Se logró cuantificar la presencia de los ácidos grasos palmítico, linoléico, linolénico y esteárico.

6.3.4.3.2.3 Cuantificación del Almidón y *RI*

El precipitado inicial de la metodología de Wanek (2001) se resuspendió en 1 ml de *M:C:A* durante 15 min a 70°C , se llevó a centrífuga a 12000g por 5 min, el sobrenadante se descartó; el precipitado se lavó en tres oportunidades con 1 ml de agua destilada a $T^\circ\text{C}$ ambiente; se adicionaron 500 μL de agua desionizada y se incubaron por 30 min a 100°C para gelatinizar el almidón; luego de enfriar a $T^\circ\text{C}$ ambiente se adicionaron 500 μL de una solución de α -amilasa (*Bacillus licheniformis Sigma-Aldrich*) y se incubaron a 85°C por 2 h; se enfrió y centrifugó a 12000g por 5 min y a 500 μL del sobrenadante se le adicionó 400 μL de cloroformo y se agitó fuertemente (*Vortex Mixer – Fisher Scientific*) para luego centrifugar a 12000g por 10 min, el precipitado fue descartado y del sobrenadante se tomaron 200 μL que contenían los productos de la hidrólisis del almidón, que se llevaron a cápsulas de estaño, se secaron al vacío y se determinó la *RI* como se describió anteriormente.

Para la cuantificación se tomaron nuevamente muestras liofilizadas y se hizo el mismo procedimiento hasta el paso previo a la gelatinización del almidón; se adicionó 1 ml de dimetil sulfóxido (*Dimethyl sulfoxide - DMSO*) al 85% y se mantuvieron durante 24 horas a $T^\circ\text{C}$ ambiente. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm ajustando el espectrofotómetro *Beckman DU-650* con un blanco de reactivos. Se construyó la respectiva curva de calibración empleando un estándar de almidón soluble de *Solanum* sp. *Sigma-Aldrich S-2630*, a partir de una solución patrón al 1%.

6.3.4.3.2.4 Cuantificación de Celulosa y *RI*

Antes de llevar la muestra inicial (100 mg de muestra liofilizada) a los tubos de reacción de 2 ml con tapa, estos fueron pesados en balanza de precisión *Mettler Toledo AB204-S*; al final del proceso y posterior secado al vacío de la muestra final de celulosa, nuevamente se pesó el tubo con la muestra, de tal manera que por diferencia de masas se obtuvo su valor ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1}$ PS).

Luego de la centrifugación posterior a la hidrólisis del almidón, a la muestra se le adicionaron 1 ml de dietilenglicol dimetil éter (*Diethylene Glicol Dimethyl Ether anhydrous 99.5% - Sigma Aldrich*) y 250 μL de una solución 10 M de ácido clorhídrico (*HCl*) y se llevó a baño maría durante 60 min a 90°C; luego de enfriarse a $T^\circ\text{C}$ ambiente, se centrifugó a 12000g por 5 min y se descartó el sobrenadante; el precipitado de celulosa se lavó tres veces con 1 ml de metanol y las mismas veces con 1 ml de agua desionizada en ebullición; luego se secó, se pesó y se llevó a cápsulas de estaño para la determinación de *RI*.

6.3.4.3.2.5 Cuantificación de proteínas y *RI*

Las proteínas se obtuvieron siguiendo la metodología de Bradford (1976) así: 150 mg de muestra liofilizada se maceraron con 4ml de buffer de extracción [100mM *Tris-HCl* (pH 8), 1mM de *EDTA*, 5mM *DTT*, 10mM *NaHCO₃*, 10mM *MgCl₂*, 0.5% *PMSF*, 2% de *PVP-40*, 3% de *PVPP*, 10mM 2-mercaptoeanol y 5% glicerol]. El macerado se filtró a través de una capa de Miracloth y dos de gasa y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min en centrífuga Eppendorf 5415C; 1 ml del sobrenadante se filtró a través de una columna *Econo-pac DG-10 (Bio-rad Lab. Inc.)* previamente estabilizada con buffer 100 mM fosfato de potasio (pH 7.5), 1 mM *EDTA-Na*, 1 mM mercaptoetanol, 5 mM cisteína y 5% de glicerol y se eluyó con el mismo buffer; de allí se tomaron 10 μL y se llevaron a cubetas de policarbonato de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso óptico (*Disposable Cuvettes – PlastiBrand®*), a las que se les adicionó 990 μL de reactivo de Bradford sin *PVP* ni *PVPP*; como blanco se utilizó reactivo de Bradford solo; posteriormente se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro *Beckman DU-650* y se determinó la concentración de proteína total [$\text{mg}_{(\text{proteína})} \text{g}^{-1}$ PS] de acuerdo con una curva patrón previamente construida haciendo uso de *Albúmina Sérica Bovina (ASB)*.

El volumen restante, aproximadamente 3 ml, se usó para la determinación de *RI* así: a 2.5 ml de muestra se les adicionó 625 μg de sulfato de amonio [(NH_4)₂SO₄] al 85% y se centrifugó a 10000 rpm por 15 min, se tomó el precipitado y se llevó a cápsulas de estaño, se secó al vacío y se determinó la *RI* (Bollag *et al.*, 1996).

6.3.5 Análisis de la información

Se llevó a cabo el análisis descriptivo de las variables climáticas $T^\circ\text{C}$ y *HR*, así como de la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el tiempo. Se realizaron análisis de varianza de una vía y análisis de superficies que describieron la respuesta de *RI* a la $T^\circ\text{C}$ y al tiempo, para cada órgano y metabolito, así como su cuantificación. Las integraciones del área bajo la curva para obtener el total diario de fotosíntesis

$[\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}]$ y respiración $[\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}]$ se realizaron con la subrutina *AREA.XFM* del programa *Scientific Data Analysis and Graphing Software* (*SigmaPlot*® 10.0). Se realizó prueba de comparación de medias por Duncan y Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, cuando así lo indicó el análisis, utilizando el programa *Statistical Analysis System* (SAS) versión 8.0.

6.4 Resultados

6.4.1 Comportamiento de la temperatura ($T^\circ\text{C}$), humedad relativa (HR - %) e intercambio gaseoso (Fotosíntesis - F y Respiración - R) $[\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}]$ en plantas completas

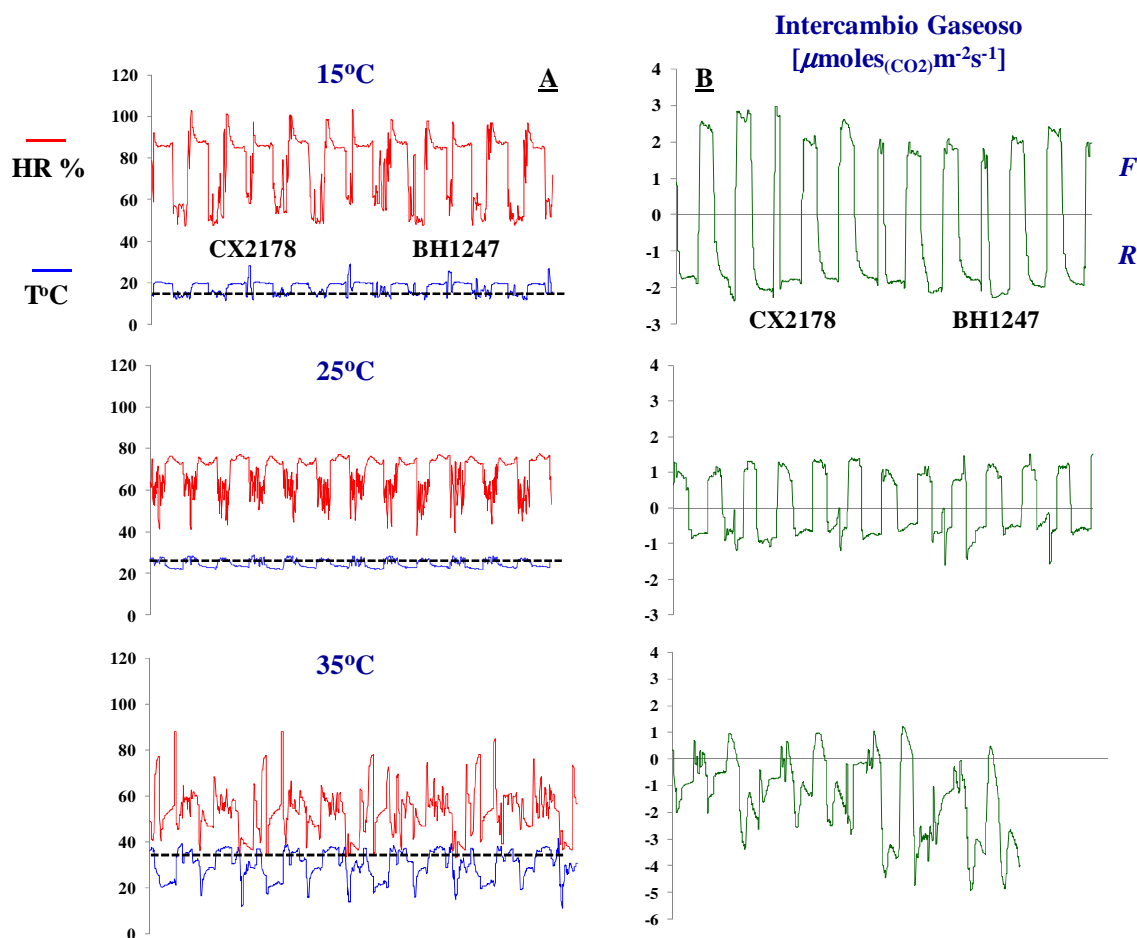
El comportamiento cíclico de la HR y de la $T^\circ\text{C}$ se aprecian homogéneos a través de los días de medición en la figura 6-3A. La HR depende de la $T^\circ\text{C}$, de tal forma que a medida que aumenta los valores medios disminuyen y a los 35°C se presentó la mayor variabilidad. El experimento pretendió mantener la $T^\circ\text{C}$ del aire en valores aproximados a los 15°C , 25°C y 35°C , lo cual se logró, pues la oscilación diaria se mueve alrededor del promedio, como se muestra en las líneas punteadas de la figura 6-3A. Todo lo anterior se aplica a los dos genotipos estudiados.

La magnitud de las curvas de IG son diferentes para los tres casos (figura 6-3B), con mayores áreas bajo la curva a los 15°C , seguidas por 25°C y 35°C . Las tasas de F y R son fuertemente afectadas a los 35°C , lo que sugiere la inestabilidad del metabolismo para ésta especie a altas $T^\circ\text{C}$, lo cual se hace evidente al integrar los valores bajo la curva (para F y R), tal como se muestra en la figura 6-4. Son evidentes además los altos gastos respiratorios para la especie en altas $T^\circ\text{C}$, lo cual puede estar relacionado con la removilización de los asimilados, la acumulación de biomasa y al final sobre la producción. En general, los valores de RFA estuvieron alrededor de $200 \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante el experimento dentro de la cámara de crecimiento. Puesto que el punto de compensación de luz en el cafeto está alrededor de $10 \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, y el punto de saturación en $600 \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, valores de $200 \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ son suficientes y adecuados para garantizar actividad fotosintética (Tio, 1962; Yamaguchi y Friend, 1979; Kumar y Tieszen, 1980b; Riaño, 1991; Gómez *et al.*, 2005).

A los 15°C y 25°C no se presentaron diferencias estadísticas significativas para F y R entre tratamientos ni entre genotipos, mientras a los 35°C hubo diferencias en R entre genotipos, con mayores valores para el testigo de *BH1247* (figura 6-4).

Las mayores tasas de F se obtuvieron a los 15°C seguidas por los 25°C y finalmente a los 35°C , donde se presentaron las menores tasas, encontrando incluso tasas negativas para el promedio del control del material *BH1247* (figura 6-4).

Figura 6-3: Humedad relativa (%) y temperatura (°C) (**A**) e intercambio gaseoso (F = Fotosíntesis, R = Respiración) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (**B**), a los 15°C, 25°C y 35°C, en plantas completas de *Coffea arabica* L. var. Castillo® El Rosario, genotipos CX2178 y BH1247, durante cuatro días continuos. Las líneas punteadas en **A** muestran la temperatura del tratamiento.



6.4.2 Diferencias entre $T^\circ\text{C}$ para Fotosíntesis y Respiración

Los análisis de varianza (anava) y prueba de Duncan (95%) mostraron diferencias estadísticas altamente significativas para F y R entre las $T^\circ\text{C}$ a las cuales fueron sometidas las plantas ($P < 0.0001$) (Anexo 6-1) con valores de 71928.0, 36078.1 y 5246.9 $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$, para 15°C, 25°C y 35°C respectivamente, y la respuesta fue inversamente proporcional, de tal manera que a menor $T^\circ\text{C}$ mayor tasa de F (figura 6-5A).

Se presentaron mayores tasas respiratorias a 35°C, seguidas por 15°C y 25°C, con valores de -111308, -84302, -31480 $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$, respectivamente (figura 6-5B). Se observa mayor variabilidad a los 35°C. El anava y prueba de Duncan (95%) encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) (anexo 6-1). El balance de asimilación neta de CO_2 (fotosíntesis neta - F_n) fue de -12374.0, +4598.1 y -106061.1 $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$ para 15°C, 25°C y 35°C respectivamente.

Figura 6-4: Integración del área bajo la curva promedio diaria de fotosíntesis (F) y respiración (R) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] en plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, a los 15°C, 25°C y 35°C, para plantas marcadas y control, por genotipo (BH1247 y CX2178). Las barras indican el error estándar del promedio. n=3 días completos de medición.

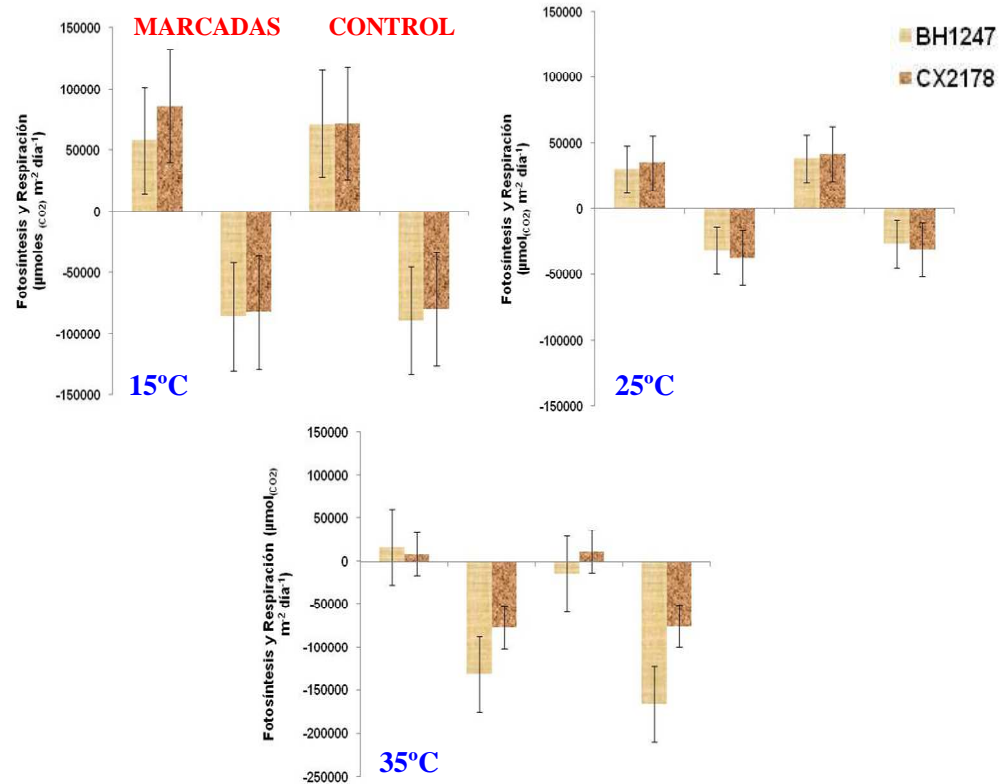
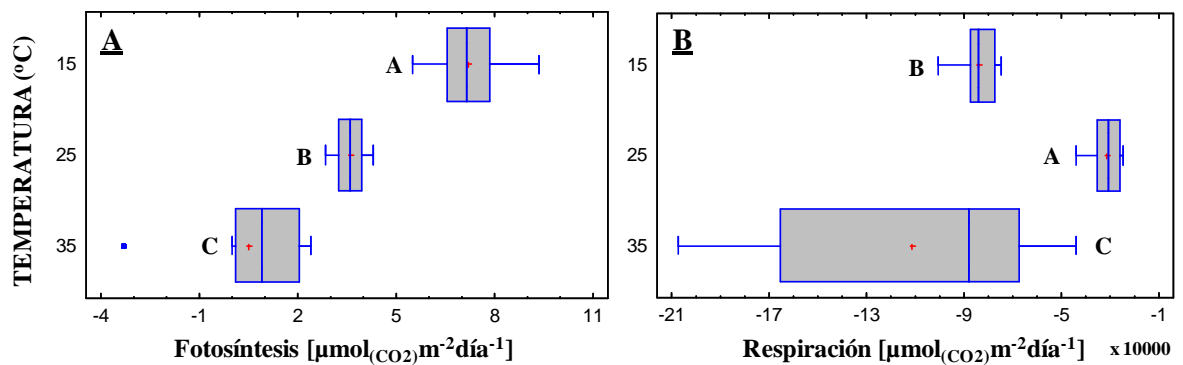


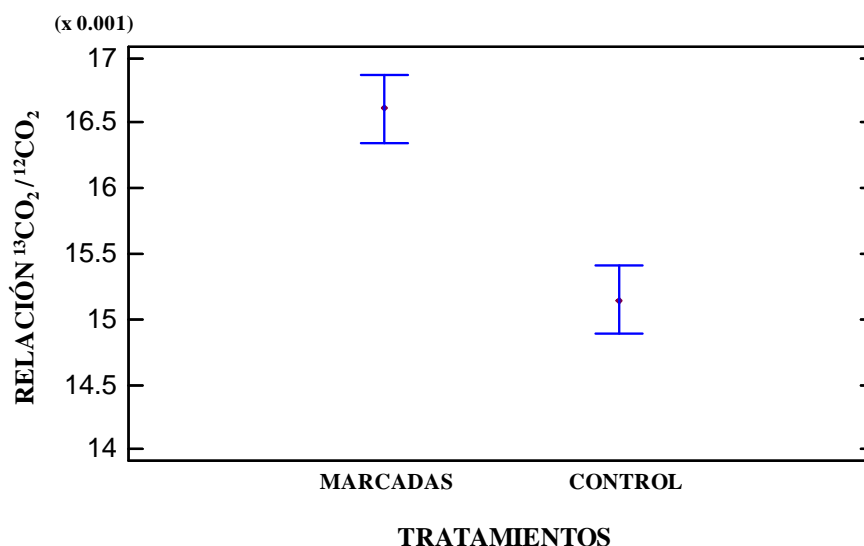
Figura 6-5: Valores promedio de F (A) y R (B) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] y su variabilidad, en plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre temperaturas (Duncan 0.05).



6.4.3 Diferencias en la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) entre plantas Marcadas y Control

Inicialmente y con el fin de evaluar si la metodología de marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$ para este experimento fue adecuada, se realizó el análisis estadístico (anava y prueba de Tukey-95%) en la que se incorporaron todas las variables del experimento ($T^\circ\text{C}$, tratamiento, órgano, metabolito y tiempo). Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre plantas marcadas y control ($P < 0.0001$) y un R^2 de 69.86% (anexo 6-2), con valores promedios de 0.0166099 y 0.0151417 en RI , respectivamente. Este resultado permite confirmar que la metodología de marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$ usada para el seguimiento de los principales metabolitos fotosintéticos y respiratorios, en respuesta a diferentes condiciones de $T^\circ\text{C}$, funcionó adecuadamente (figura 6-6).

Figura 6-6: Diferencias en la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) entre tratamientos. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=629$ para marcadas, $n=622$ para control.

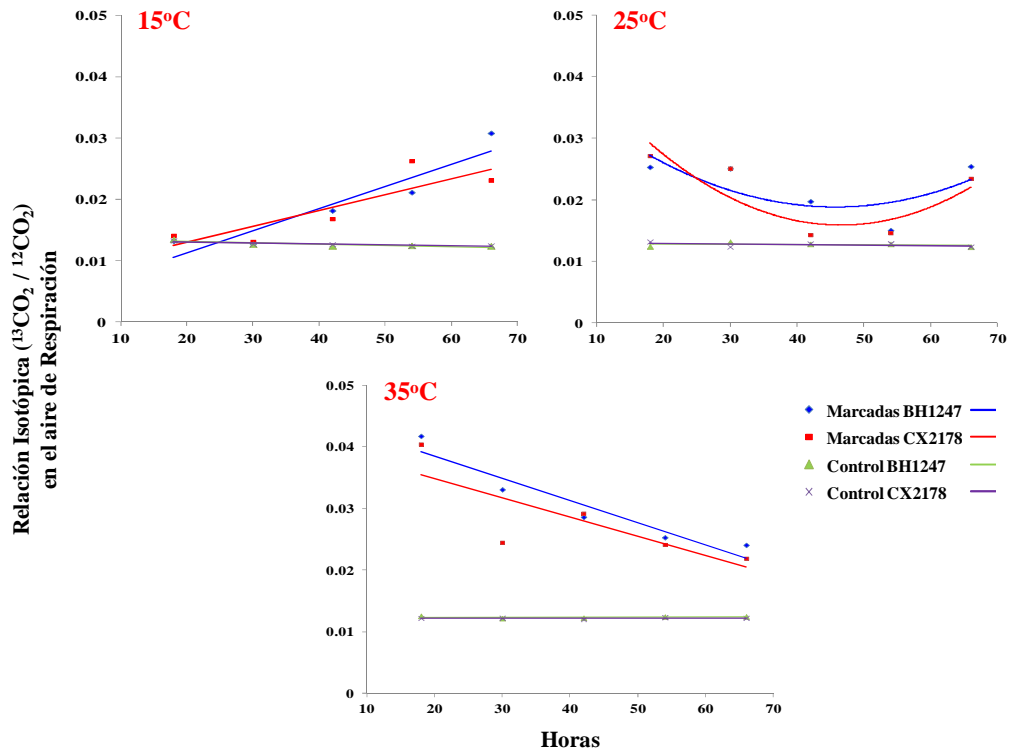


6.4.4 Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por las plantas completas

El comportamiento de la RI en el aire de R por las plantas completas, para las tres $T^\circ\text{C}$, las cuales permanecieron en total oscuridad durante 66 horas posteriores a la marcación se presenta en la figura 6-7. Puesto que la mayor actividad fotosintética se obtuvo a los 15°C , el dióxido de carbono marcado fue asimilado e incorporado en compuestos que luego fueron removilizados lentamente a otros órganos de crecimiento activo, lo cual se evidencia en el incremento de la RI en el aire de R al final de la medición, cerca de las 70 horas a la oscuridad. Cuando se mantuvieron las plantas a la oscuridad y expuestas a 25°C constante, se aprecia una liberación inmediata de CO_2 marcado, que disminuye la removilización del asimilado a otras regiones de la planta, para luego ser liberado por respiración hacia el final del experimento. Contrario a lo anterior, ya se había presentado en las figuras 6-4 y 6-5 que las mayores tasas respiratorias se presentaron a los 35°C con alto gasto energético, lo que se evidencia rápidamente en el

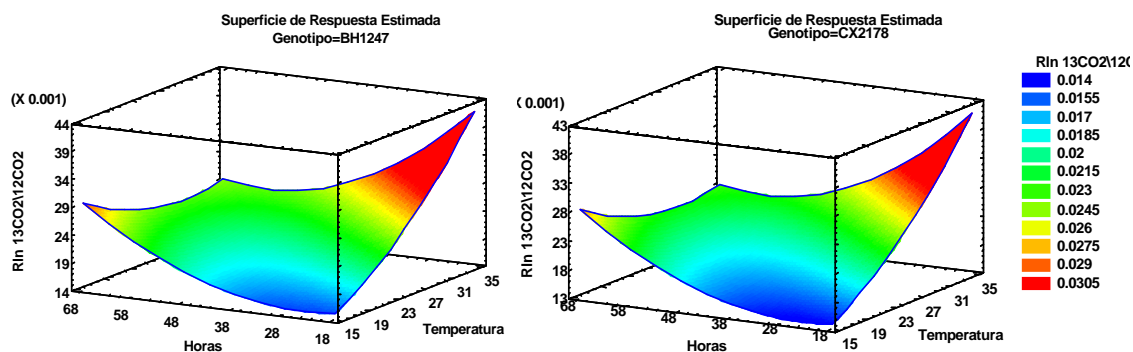
decrecimiento de la *RI*. En general, el comportamiento fue similar para los genotipos estudiados.

Figura 6-7: Comportamiento de la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo El Rosario® genotipos *BH1247* y *CX2178*, con relación al tiempo, entre 0 y 66 horas posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, para temperaturas del aire de 15°C, 25°C y 35°C, en plantas marcadas y control.



Al integrar la información de las tres $T^\circ\text{C}$ en modelos de respuesta espacial, se encontraron diferencias estadísticas entre genotipos ($P=0.038$), en la interacción $T^\circ\text{C}$ por horas de muestreo ($P=0.0004$) y en $T^\circ\text{C}^2$ ($P<0.0001$). El modelo general es altamente significativo ($P<0.0001$) para cada genotipo, con un R^2 de 81.53% (anexo 6-3). En la figura 6-8 se observa que el comportamiento de cada genotipo con la interacción entre la $T^\circ\text{C}$ y el tiempo fue similar, de tal forma que para ambos los mayores valores de *RI* se presentaron a los 35°C y un comportamiento decreciente con el tiempo; en tanto que a los 15°C se presentan los menores valores y un comportamiento creciente con el tiempo. A los 25°C se presenta un comportamiento decreciente hasta las 24 horas para luego ascender hasta las 48 horas.

Figura 6-8: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el aire respirado por plantas completas de *Coffea arabica* L. var. Castillo® El Rosario y su interacción con la $T^\circ\text{C}$ y tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, en los genotipos *BH1247* y *CX2178*.



El modelo que describe el comportamiento de las graficas de la figura 6-8 es:

$$\begin{aligned} \text{Relación } {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2 \text{ Aire respirado} = & 0.0022651 + 0.00062349 * I(1) + 0.00061889 * \text{Temperatura} \\ & + 0.000348644 * \text{Horas} - 0.0000463939 * \text{Temperatura} * \text{Horas} \\ & + 0.00000494027 * \text{Horas}^2 + 0.0000300939 * \text{Temperatura}^2 + \\ & 1.65605\text{E-}7 * \text{Temperatura} * \text{Horas}^2 \end{aligned}$$

en donde:

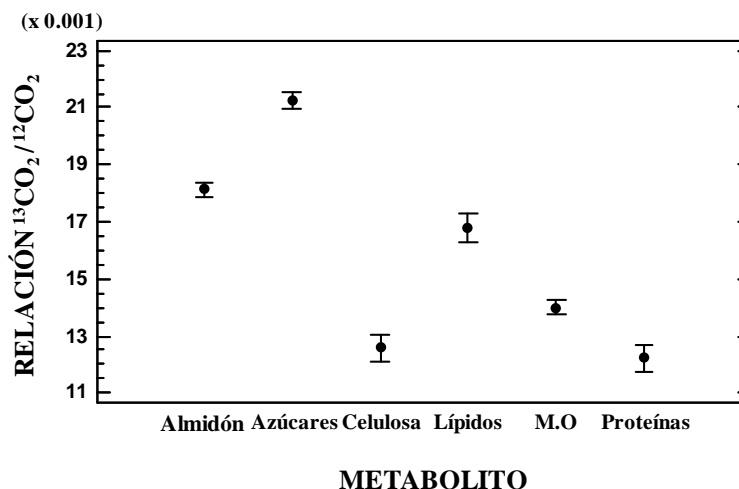
$I(1) = 1$ si Genotipo = *BH1247*; -1 si Genotipo = *CX2178*

6.4.5 Diferencias en la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) entre metabolitos

Con el fin de determinar si se alcanzó la marcación de los metabolitos fotosintéticos, se llevó a cabo un anava general con todos los datos de RI en respuesta a todas las variables asociadas al experimento (figura 6-9).

Tal como se complementa con la información presentada en el anexo 6-4, tanto los metabolitos ($P < 0.0001$) como las $T^\circ\text{C}$ evaluadas ($P = 0.0187$), los tratamientos ($P < 0.0001$) y el tiempo de evaluación ($P = 0.0489$) fueron estadísticamente diferentes, lo cual sugiere que las diferencias encontradas en RI entre metabolitos se deben a la influencia de cada uno de estos factores. En el análisis no se encontraron diferencias entre órganos ($P = 0.3642$), pero se mostrará adelante, cómo la separación de cada metabolito dentro de cada órgano, muestra una dinámica diferencial. Las variables peso seco ($P = 0.1253$) y área foliar ($P = 0.6826$) entraron en el análisis como covariables, ya que mostraron no influir en la respuesta.

Figura 6-9: Diferencias en la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) entre metabolitos. Los símbolos muestran el valor promedio y las barras verticales el error estándar. $n=103$ para cada metabolito.



El orden de marcación de los compuestos se presenta de igual forma en la figura 6-9, donde hubo mayor marcación para los azúcares seguidos por el almidón y los lípidos, con diferencias estadísticas entre ellos. Los menores valores de RI se encontraron para la celulosa y las proteínas sin diferencias entre ellos. El orden de magnitud de RI en cada uno de los grupos de compuestos estudiados, muestra la confiabilidad del método para seguir la dinámica funcional y metabólica del carbono, y la secuencia lógica de eventos que se asocian con el metabolismo, en cuanto a la construcción de moléculas cada vez más complejas.

6.4.6 Área foliar (m^2) y peso seco (g) del material vegetal

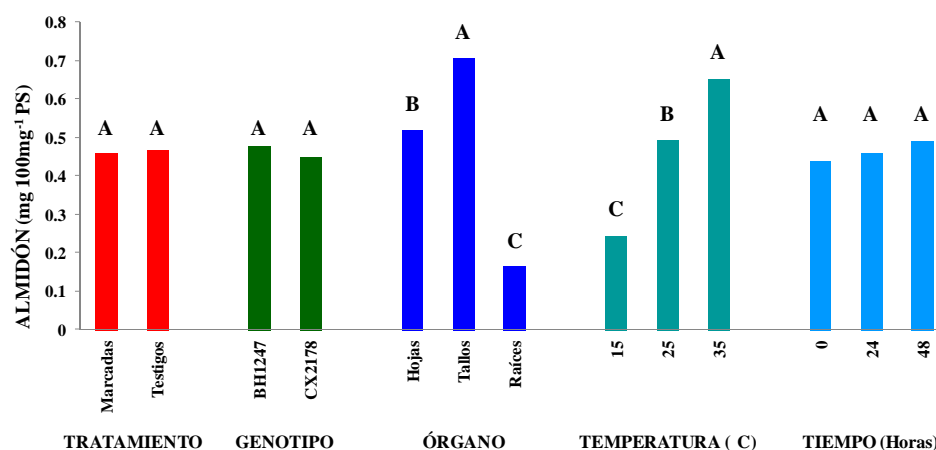
El crecimiento de los genotipos en función de la $T^\circ\text{C}$ a la cual estuvieron expuestos durante el experimento, se refleja en los valores finales de acumulación de materia seca, así el mayor valor lo alcanzaron plantas sometidas a 25°C ($4.03 \text{ g planta}^{-1}$), que es concordante con las mayores tasas fotosintéticas y balance neto de carbono resultante para el crecimiento. Para las temperaturas 15°C y 35°C , los valores de acumulación promedio fueron de $3.63 \text{ g planta}^{-1}$ y $3.35 \text{ g planta}^{-1}$ respectivamente, lo cual está en relación con el comportamiento de IG descrito con anterioridad, dado que los gastos respiratorios a los 35°C , denotan un bajo remanente de asimilados para el crecimiento por los altos gastos respiratorios, en tanto que a 15°C , la limitante sería la baja actividad de las enzimas de carboxilación fotosintética como *Rubisco*, que tienen una alta dependencia de las condiciones térmicas exógenas, como lo demostró Riaño (1999), para plantas de cafeto. Tal como se muestra en el anexo 6-5, el análisis estadístico indica que no hubo diferencias en el comportamiento entre los genotipos estudiados. De otra parte el área foliar presentó el mismo comportamiento anotado, tanto en lo descriptivo como en el análisis estadístico, lo cual se presenta en el anexo 6-6.

6.4.7 Cuantificación de los compuestos asociados con el metabolismo del carbono

6.4.7.1 Cuantificación de almidón

La cantidad de almidón total encontrado en los órganos estudiados en el momento de la marcación y *a posteriori* se muestra en la figura 6-10. En general no se presentó un efecto del proceso de marcación en la cantidad total de almidón del componente orgánico entre genotipos y se mantuvo estable a través del tiempo, cambiando la distribución en los órganos y su síntesis en función de la $T^{\circ}\text{C}$ a la cual fueron sometidas las plantas. Ello debido además a los valores intermedios de oferta de radiación que no permiten alcanzar las máximas tasas fotosintéticas y por tanto la acumulación de almidón en el aparato fotosintético.

Figura 6-10: Contenido de almidón ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$) en hojas, tallos y raíces, en plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario genotipos BH1247 y CX2178, marcadas y control, a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a los 15°C , 25°C y 35°C . Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas al interior de los grupos (Duncan 0.05).



6.4.7.2 Cuantificación de los azúcares

Para el caso de la cuantificación total de azúcares (figura 6-11), no hubo efecto del proceso de marcación sobre la cantidad total medida, ni entre los genotipos estudiados. Para este componente, la mayor presencia se visualiza en las hojas como fuentes de producción de carbohidratos, seguido por el tallo y finalmente por la raíz. Al separar los azúcares totales en cada uno de los principales constituyentes, sacarosa y sus componentes las hexosas glucosa y fructosa, se muestra en la figura 6-12 que la fructosa es el azúcar con mayor presencia y que se empiezan a evidenciar diferencias entre los genotipos estudiados. Tal como ocurrió para los azúcares totales, se mantiene el orden de magnitud en cada uno de los órganos estudiados y no se observó efecto de las $T^{\circ}\text{C}$ y las horas transcurridas luego de la marcación sobre la cantidad individual de los azúcares constituyentes.

Figura 6-11: Contenido de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa; mg 100mg⁻¹ PS) en hojas, tallos y raíces de plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, marcadas y control, los genotipos BH1247 y CX2178, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con ¹³CO₂, a los 15°C, 25°C y 35°C. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas al interior de los grupos (Duncan 0.05).

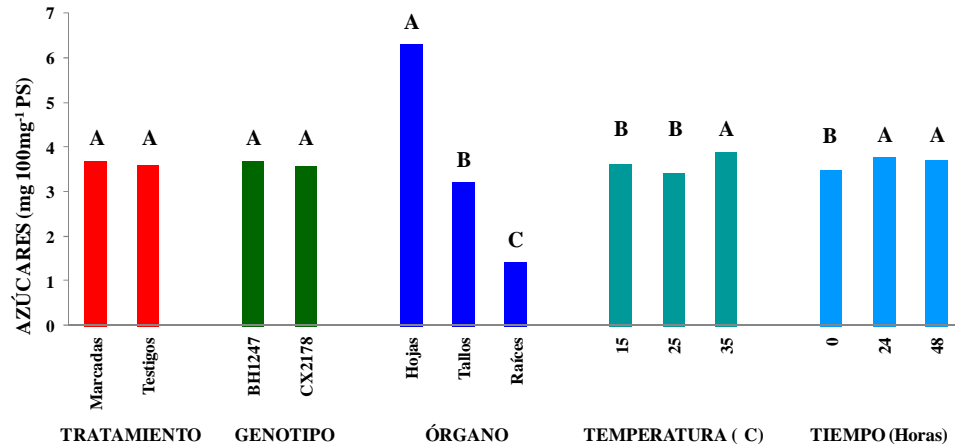
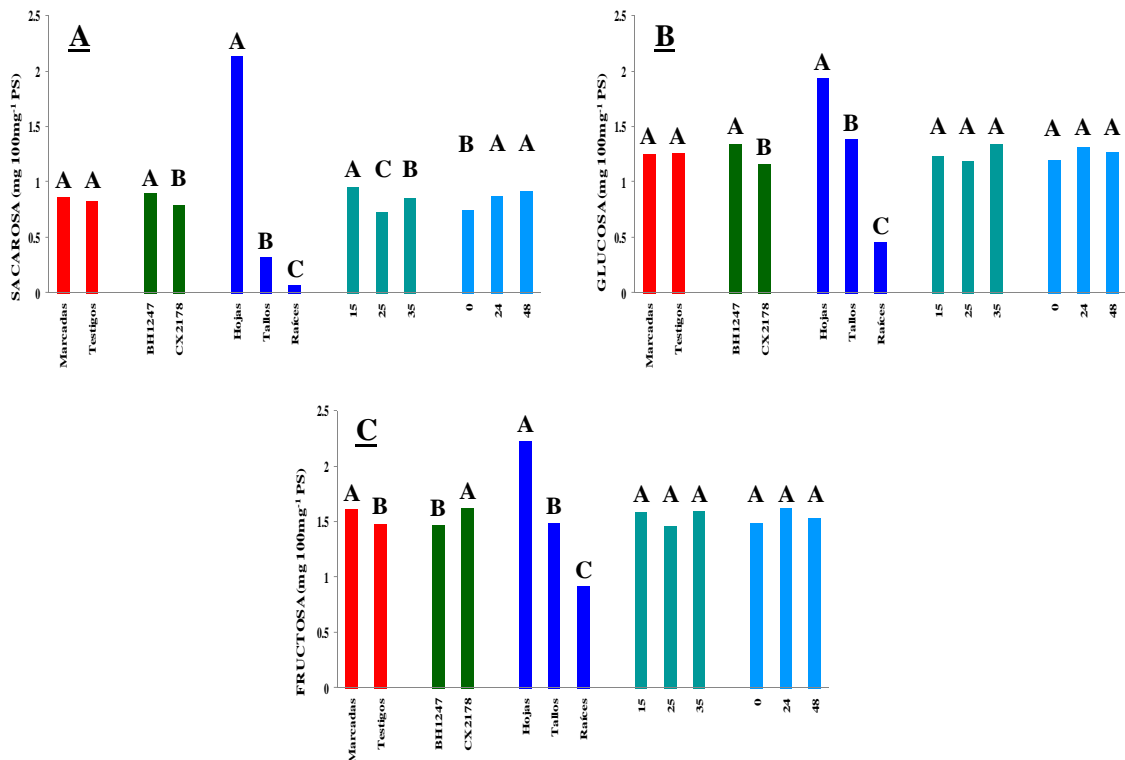


Figura 6-12: Contenido de sacarosa (A), glucosa (B) y fructosa (C) (mg 100mg⁻¹ PS) en hojas, tallos y raíces de plantas de *C. arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, para plantas marcadas y control, los genotipos BH1247 y CX2178, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con ¹³CO₂, a los 15°C, 25°C y 35°C. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas al interior de los grupos (Duncan 0.05).



6.4.7.3 Cuantificación de lípidos, proteínas y celulosa en hojas

Dada la complejidad de las determinaciones, los lípidos, proteínas y celulosa, únicamente se cuantificaron en hojas. Los lípidos se separaron en sus componentes principales como son los ácidos palmítico, linoléico, linolénico y el esteárico. Los menores valores los presentó el ácido linoléico representando únicamente el 5% del total de los ácidos grasos presentes, mientras el palmítico y el linolénico mantienen los mayores valores porcentuales con el 30-35% del total encontrado. Para los ácidos grasos linolénico y esteárico se lograron detectar diferencias estadísticas entre los genotipos estudiados, en tanto que no se encontró efecto de la $T^{\circ}\text{C}$ y se aprecia una dinámica en la presencia y composición en función del tiempo transcurrido luego de la marcación (figura 6-13). La proteína foliar total cuantificada y la celulosa se mantuvieron en valores promedio de $0,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ y de $26 \text{ mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$ respectivamente, sin efecto de la marcación, el genotipo, la $T^{\circ}\text{C}$ y el tiempo transcurrido luego de la marcación, tal como se muestra en las figuras 6-14 y 6-15.

Figura 6-13: Cuantificación de los Lípidos (%) [ácidos palmítico (**A**), linoléico (**B**), linolénico (**C**) y esteárico (**D**)] en las hojas de plantas de *C. arabica* L. cv. Castillo® El Rosario, plantas marcadas y control, los genotipos *BH1247* y *CX2178*, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a 15°C , 25°C y 35°C . Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas al interior de los grupos (Duncan 0.05).

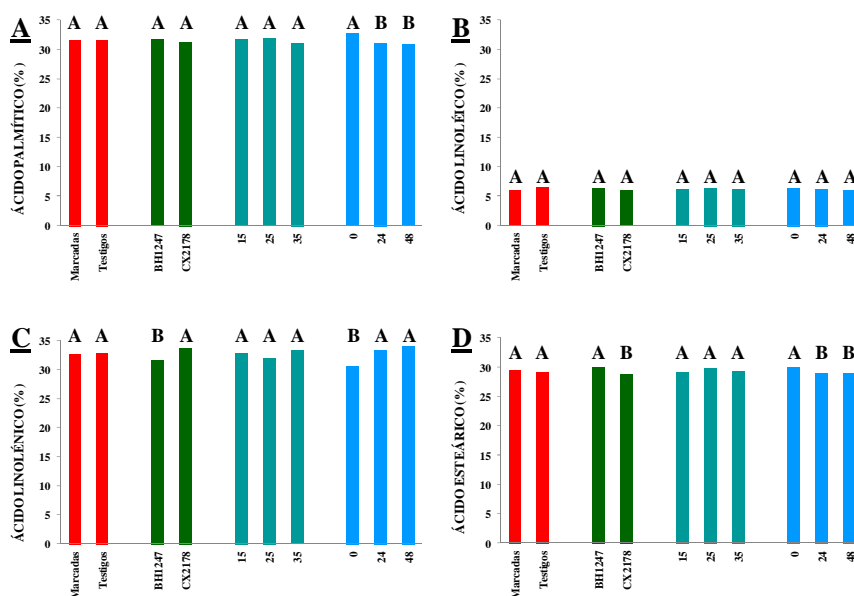


Figura 6-14: Contenido de proteínas (mg g^{-1} PS) en hojas de plantas marcadas y control, los genotipos *BH1247* y *CX2178*, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a los 15°C , 25°C y 35°C . Promedios con letras iguales no denotan diferencias estadísticas entre grupos (Duncan 0.05).

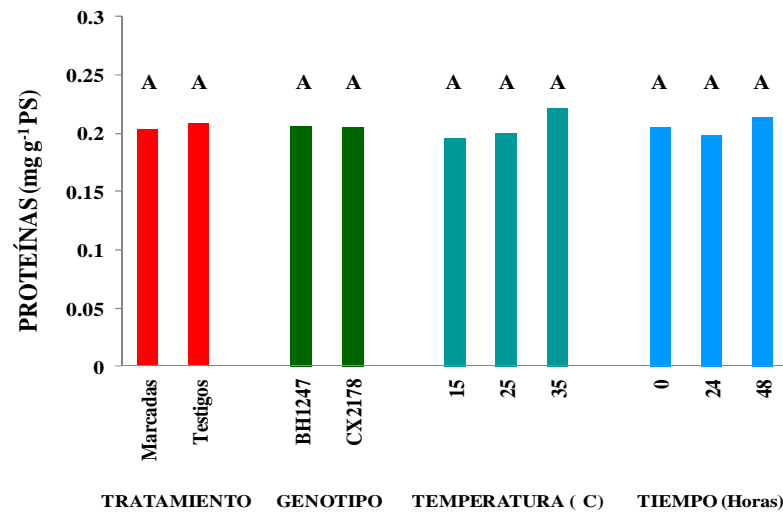
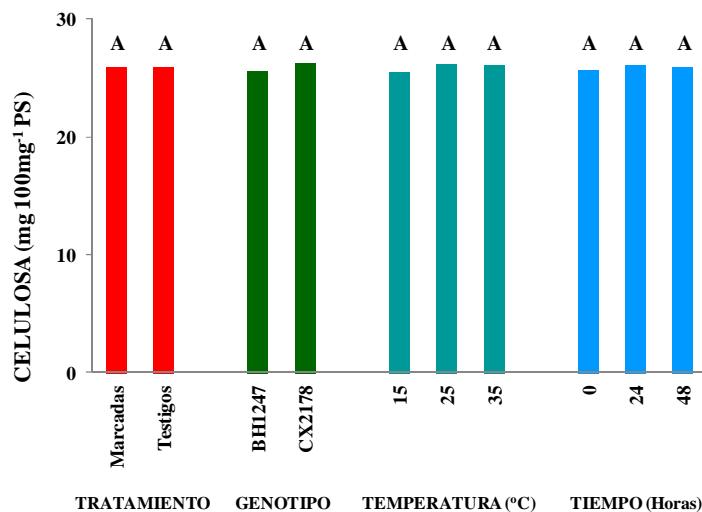


Figura 6-15: Contenido de celulosa (mg 100mg^{-1} PS) en hojas, para plantas marcadas y control, los genotipos *BH1247* y *CX2178*, cuantificados a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, a los 15°C , 25°C y 35°C . Promedios con letras iguales no denotan diferencias estadísticas entre grupos (Duncan 0.05).

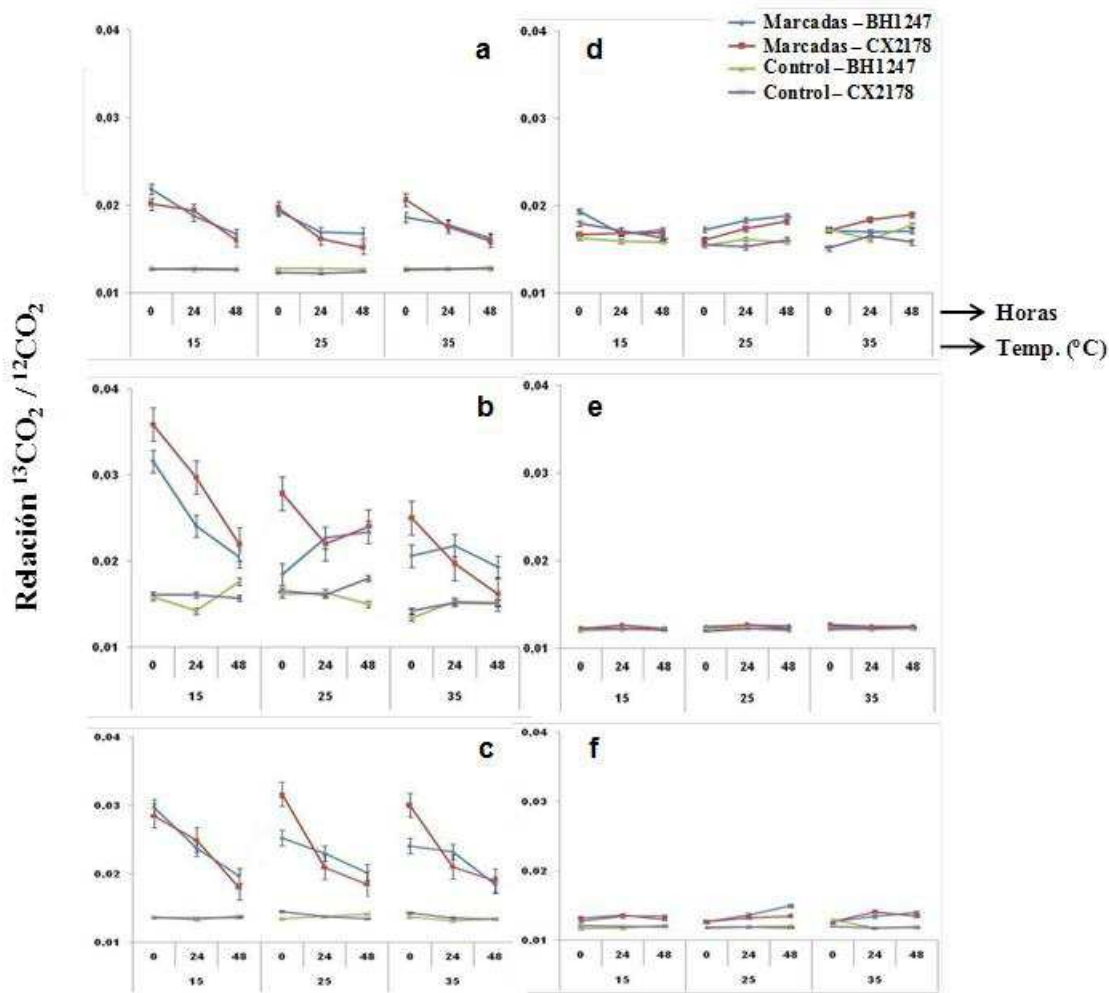


6.4.8 Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en las hojas

Como se indicó anteriormente y se mostró en la figura 6-6, la metodología empleada para garantizar la incorporación del ^{13}C en el metabolismo fotosintético del café fue exitosa, lo cual se evidencia además en la presencia del trazador en los diferentes componentes medidos (figura 6-16), independiente del genotipo estudiado y el efecto térmico al cual fueron sometidas las plantas. Para el caso de la RI en la materia orgánica (figura 6-16a), los mayores valores se muestran en el momento de la

marcación y disminuyen a través del tiempo, lo cual denota un gasto respiratorio similar en los genotipos y mayores tasas a los 25°C y 35°C. En general todos los compuestos directamente relacionados con el metabolismo del carbono de forma secuencial presentan valores de *RI* mayores que los controles, de tal manera que los almidones (figura 6-16b) y azúcares (figura 6-16c) presentan valores superiores de discriminación al inicio de la marcación y disminuyen con el tiempo, independiente de la *T°C*. A diferencia de los 15°C y 25°C, a los 35°C y para ambos genotipos a las 48 horas, la *RI* de los almidones marcados fue igual que la del testigo, lo cual refleja el mayor gasto metabólico mencionado. La movilización del carbono marcado se dirige luego a los lípidos (figura 6-16d), que aparecen con $^{13}\text{CO}_2$ a las 24 horas para las temperaturas de 25°C y 35°C. A los 15°C parece que hay restricciones térmicas y la presencia de compuestos marcados a través de la *RI* fue menor. De igual forma la celulosa (figura 6-16f) aparece rápidamente marcada, y es bien conocido y descrito que un alto porcentaje del metabolismo del carbono se direcciona a la formación de componentes de pared celular, asociados con la expansión celular y el crecimiento. En cuanto a las proteínas (figura 6-16e), los intermediarios del metabolismo primario, ciclo de Calvin, ciclo de Krebs y Glicólisis anaerobia, quienes son los componentes carbonados de los aminoácidos, pueden no estar marcados lo que hace que su marcación sea muy baja o nula. En los casos que se encontraron diferencias estadísticas entre genotipos, generalmente fueron a favor del material CX2178, lo cual puede explicar su mayor acumulación de materia seca y producción a lo largo de su ciclo de vida (Alvarado *et al.*, 2005).

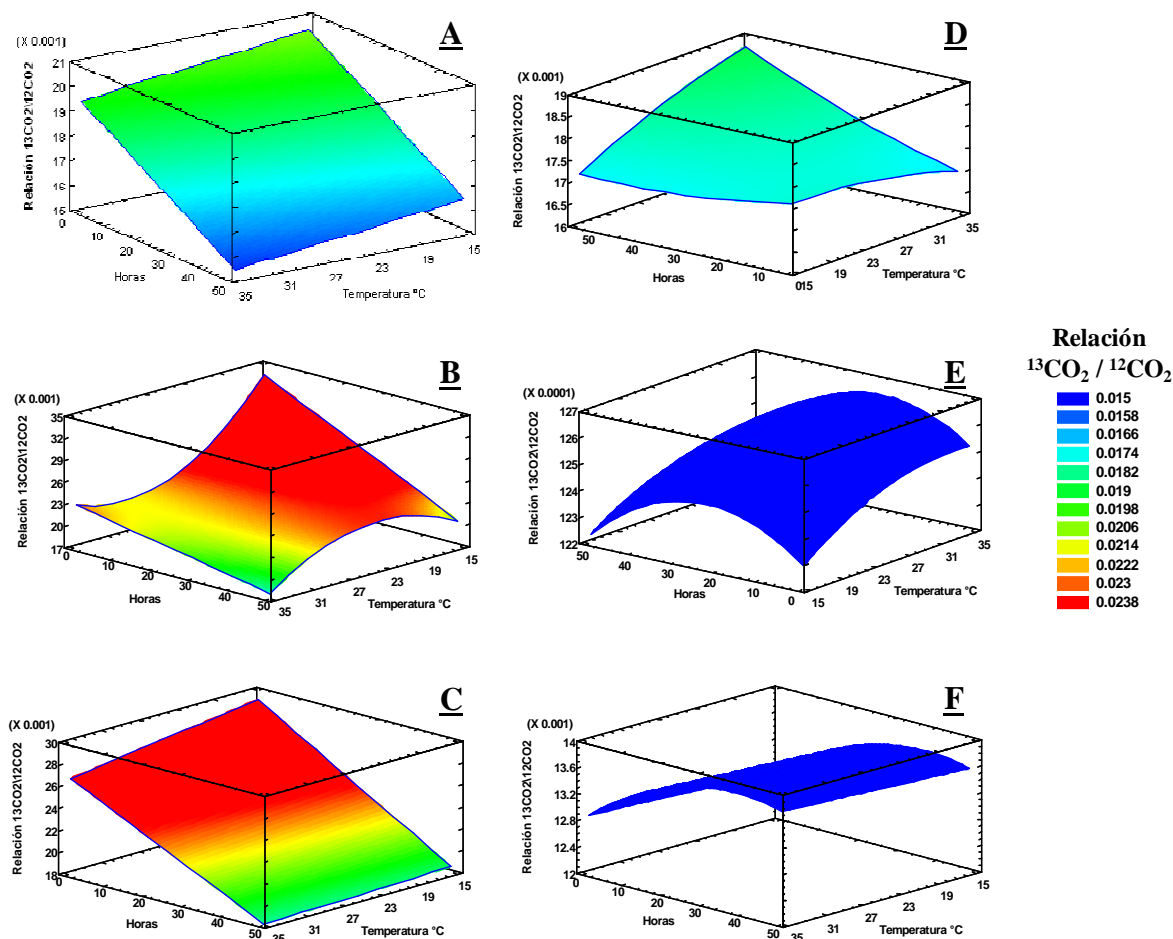
Figura 6-16: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en las hojas: material orgánico (a), almidón (b), azúcares totales (c), lípidos (d), proteínas (e) y celulosa (f), a los 15°C, 25°C y 35°C, las 0, 24 y 48 horas después de la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, genotipos *BH1247* y *CX2178*, plantas marcadas y control. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada temperatura, genotipo, tiempo y tratamiento.



6.4.8.1 Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas - Hojas

Para describir la dinámica de la distribución de RI de los principales compuestos del metabolismo bioquímico (MO , almidón, azúcares totales, lípidos, proteínas totales y celulosa) se desarrollaron modelos espaciales en hojas, tallos y raíces, en respuesta a la interacción entre $T^\circ\text{C}$ y tiempo, de tal manera que permitiera entender mejor su movimiento a través de la relación Fuente-Demanda.

Figura 6-17: Modelos espaciales que describen la RI ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en respuesta a la interacción entre $T^\circ\text{C}$ y tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ en hojas de plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo El Rosario®. Material orgánico (**A**), almidón (**B**), azúcares totales (**C**), lípidos (**D**), proteínas totales (**E**) y celulosa (**F**).



La dinámica del carbono marcado se visualiza en la figura 6-17, al relacionar la RI con el tiempo y la $T^\circ\text{C}$ en modelos espaciales. Tanto los modelos generales para MO , como para almidón y azúcares totales fueron altamente significativos ($P < 0.0001$; $R^2 > 55\%$), para celulosa fue significativo ($P = 0.0021$; $R^2 = 30.6\%$), mientras los lípidos y las proteínas totales no presentaron significancia estadística ($P = 0.3272$ y $P = 0.0907$; $R^2 > 10 < 20\%$) respectivamente (anexos 6-7, 6-8, 6-9, 6-10, 6-11 y 6-12).

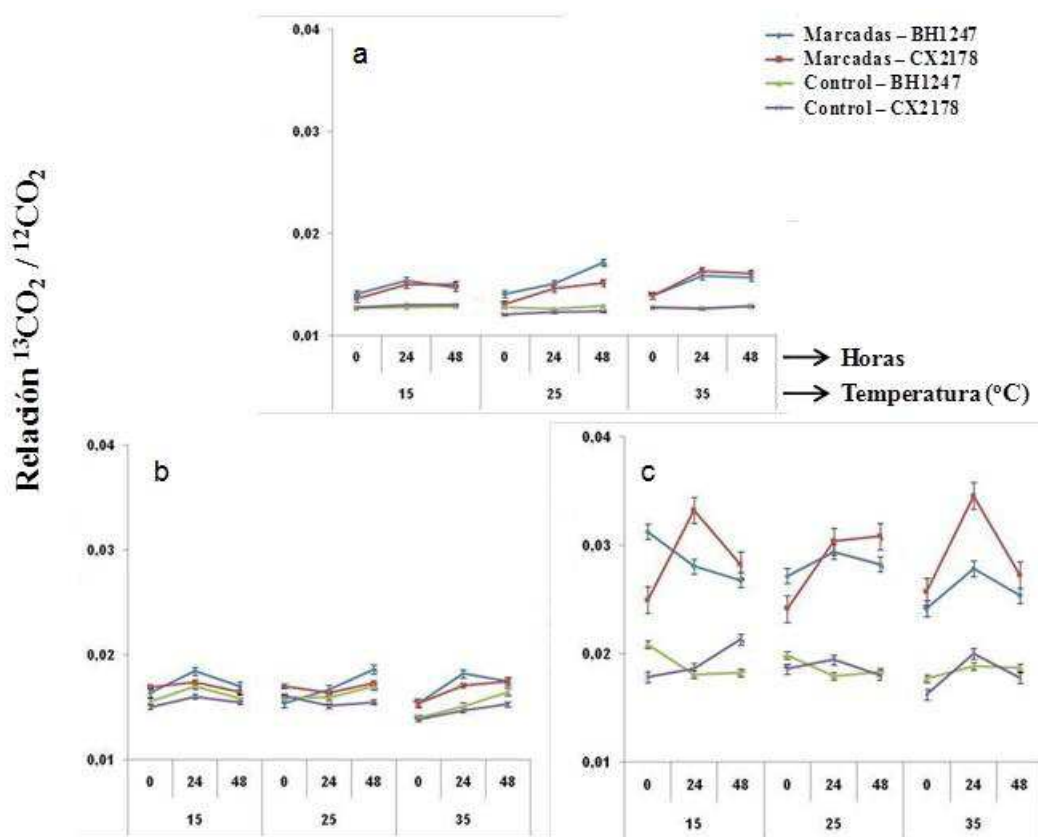
Se observan los dos grupos de metabolitos mencionados como los que tuvieron mayor marcación, de acuerdo con el compuesto inicial formado a través del ciclo de Calvin. El MO figura (6-17A) obtuvo valores intermedios producto del agrupamiento de todos los compuestos analizados, con una clara disminución en su RI a través del tiempo y una influencia de la $T^\circ\text{C}$, con los menores valores a los 35°C , lo cual denota el mayor gasto energético mencionado. Mayor marcación presentó el almidón a los 15°C (figura 6-17B) desde el inicio del experimento presentando una mayor disminución en el tiempo frente a las otras dos $T^\circ\text{C}$. A los 35°C , por la mayor actividad metabólica reflejada en el proceso respiratorio (figuras 6-3, 6-4, 6-5 y 6-7) la marcación del almidón fue menor, mientras a los 25°C el metabolismo fue más regulado, con un

comportamiento intermedio. Independiente de la $T^{\circ}\text{C}$ los azúcares totales (figura 6-17C) fueron marcados y con el paso del tiempo fueron metabolizados y distribuidos hacia otros órganos de las plantas. Hubo mayor marcación desde el inicio del experimento a los 15°C , seguido por 25°C y 35°C . En ningún caso se obtuvieron valores iguales al testigo, lo que sugiere que aún 48 horas después de la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, aún se encuentran azúcares sintetizados en las hojas con dos días de anterioridad, concepto importante en términos de reservas energéticas y relación Fuente-Demanda de carbohidratos. Si bien los modelos para los lípidos y las proteínas no presentaron significancia estadística (figuras 6-17D y 6-17E) se observa para los primeros mayor marcación a los 35°C y ascendente en el tiempo, con similar comportamiento pero en menor grado a los 25°C , mientras a los 15°C solo se encontró marcación al inicio del experimento (figura 6-16d) como se mencionó anteriormente. En cuanto a las proteínas (figura 6-17e) se puede sugerir un pequeño ascenso a las 24 horas y posterior caída a los 48 horas en las tres $T^{\circ}\text{C}$, con mayor valor de RI a los 35°C . Finalmente se encontró formación de celulosa, independiente de la $T^{\circ}\text{C}$, que refleja la síntesis de pared celular y crecimiento en el tiempo. En los anexos 6-7, 6-8, 6-9, 6-10, 6-11 y 6-12 se relacionan cada uno de los modelos que explican los comportamientos mencionados.

6.4.9 Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en el tallo

Contrario al comportamiento presentado por los principales metabolitos fotosintéticos en las hojas, en el tallo el MO , el almidón y los azúcares totales (figuras 6-18a, 6-18b y 6-18c) en general tuvieron una respuesta ascendente con el paso del tiempo, lo que sugiere que parte de los metabolitos sintetizados en las hojas fueron enviados hacia este órgano mostrando una función de demanda.

Figura 6-18: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el tallo: material orgánico (a), almidón (b) y azúcares totales (c), a los 15°C, 25°C y 35°C, las 0, 24 y 48 horas después de la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, genotipos *BH1247* y *CX2178*, plantas marcadas y control. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada temperatura, genotipo, tiempo y tratamiento.

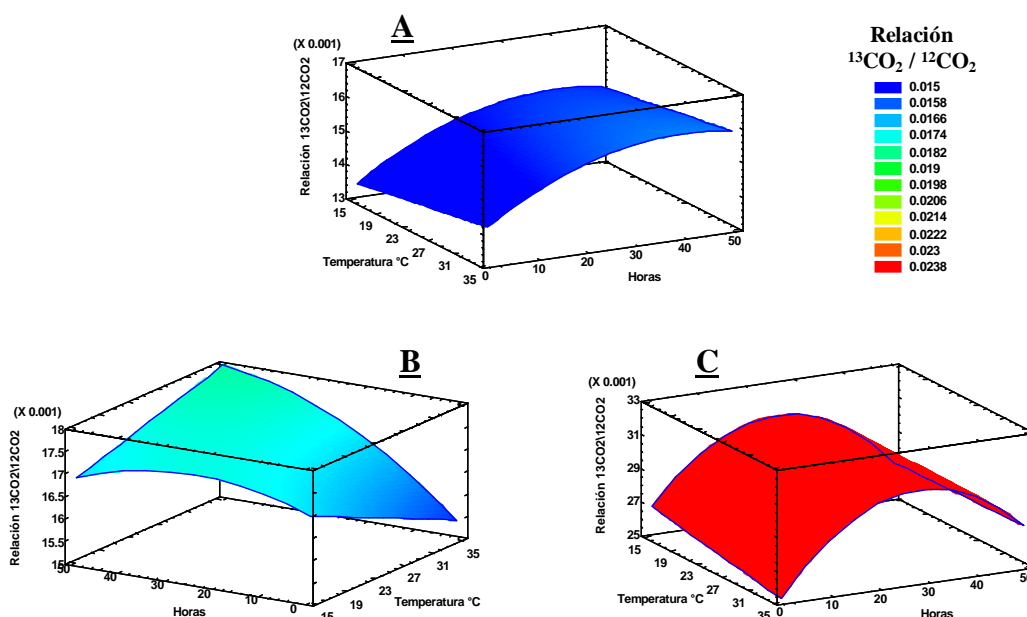


El *MO* desde el inicio del experimento mostró marcación, y las $T^\circ\text{C}$ 15°C y 35°C luego de las 24 horas se estabilizaron, mientras a los 25°C continuó acumulando carbono marcado. Hubo mayor *RI* de los azúcares totales en las tres $T^\circ\text{C}$ con un comportamiento de estabilización o de mayor acumulación similar al *MO*, y en los casos de diferencias entre genotipos, esta fue mayor para el *CX2178*. Los almidones mostraron marcación fundamentalmente a los 35°C, mientras en las otras $T^\circ\text{C}$ las diferencias con el testigo no fueron muy claras.

6.4.9.1 Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas - Tallo

La dinámica de los metabolitos marcados con ${}^{13}\text{CO}_2$ en el tallo en relación con el tiempo y la temperatura (figura 6-19) fue significativa para los compuestos evaluados en este órgano (<0.0001 , 0.0069 y 0.0048) y coeficientes de determinación de 55.4, 22.5 y 27.2% para *MO*, almidón y azúcares totales, respectivamente (anexos 6-13, 6-14 y 6-15).

Figura 6-19: Modelos espaciales que describen la RI ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en respuesta a la interacción entre $T^\circ\text{C}$ y tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ en plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo El Rosario®. Material orgánico (**A**), almidón (**B**), azúcares totales (**C**).



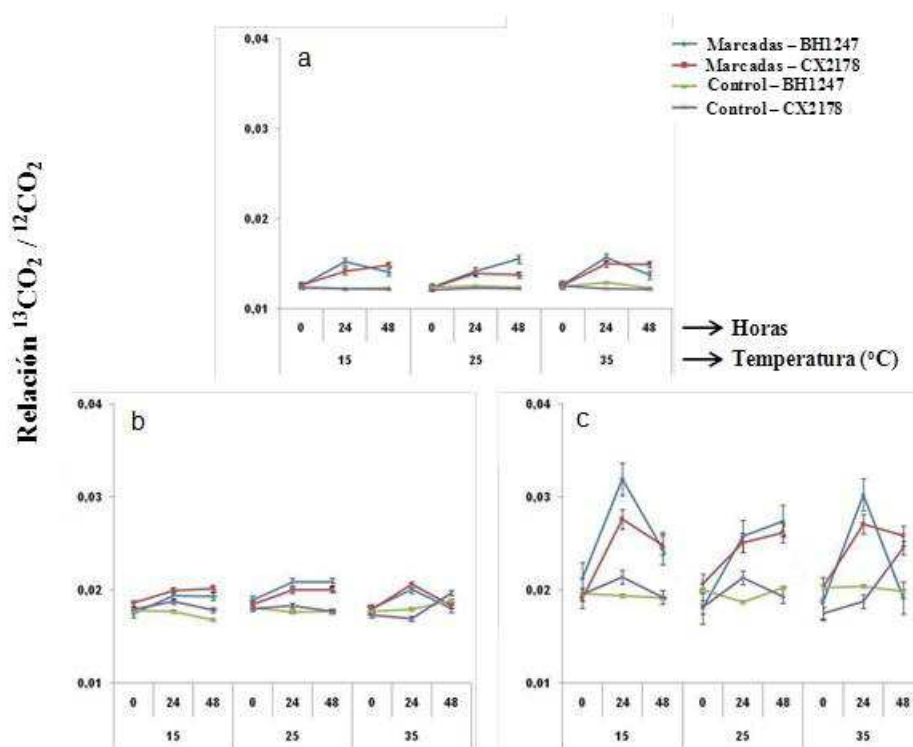
Se observa para todos un incremento en el tiempo hasta las 24 horas posteriores a la marcación para luego disminuir. En el tiempo cero hubo mayor marcación del almidón (figura 6-19B) y los azúcares totales (figura 6-19C) a los 15°C , pero en la medida que transcurrió el tiempo el metabolismo fue más rápido a 25°C y 35°C respectivamente ya que al final del experimento estos compuestos presentaron mayor marcación lo cual sugiere un metabolismo más dinámico, siendo mayores los valores de RI para los azúcares totales, como quiera que a través del tallo estos se transportan hacia los diferentes órganos de demanda, a diferencia de los almidones, que son de reserva, como se mencionó anteriormente. En los anexos 6-13, 6-14 y 6-15 se relacionan cada uno de los modelos que explican los comportamientos mencionados.

6.4.10 Relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en la raíz

La raíz en general es un órgano de demanda, pues gran parte de su gasto energético se destina al transporte de iones y a mantener la presión de pared, para garantizar el continuo suelo-planta-atmósfera. En los tres casos analizados solo se observó marcación a partir de las 24 horas, que significa que debió pasar un período de tiempo para que los compuestos marcados y fotosintetizados en las hojas se transportaran a este órgano vertedero. El valor de RI del almidón (figura 6-20b) fue mayor que para el tallo como era de esperar, presentando mayores valores a los 25°C los que se estabilizaron después de las 24 horas. Similar comportamiento se presentó a los 15°C pero en menores proporciones. A los 35°C se observa como, por efecto de las altas $T^\circ\text{C}$, el metabolismo es más rápido ya que ascendió hasta las 24 horas posteriormente disminuyó hasta el nivel del control, sugiriendo un mayor gasto energético. Los azúcares totales (figura 6-20c), cuyos valores fueron menores que los observados para

el tallo, presentaron para las dos $T^{\circ}\text{C}$ extremas un aumento hasta las 24 horas para luego caer, mientras a los 25°C aumentó hasta el final del experimento como producto de un metabolismo más estable.

Figura 6-20: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en la raíz: material orgánico (a), almidón (b) y azúcares totales (c), a los 15°C , 25°C y 35°C , las 0, 24 y 48 horas después de la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, genotipos *BH1247* y *CX2178*, plantas marcadas y control. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada temperatura, genotipo, tiempo y tratamiento.

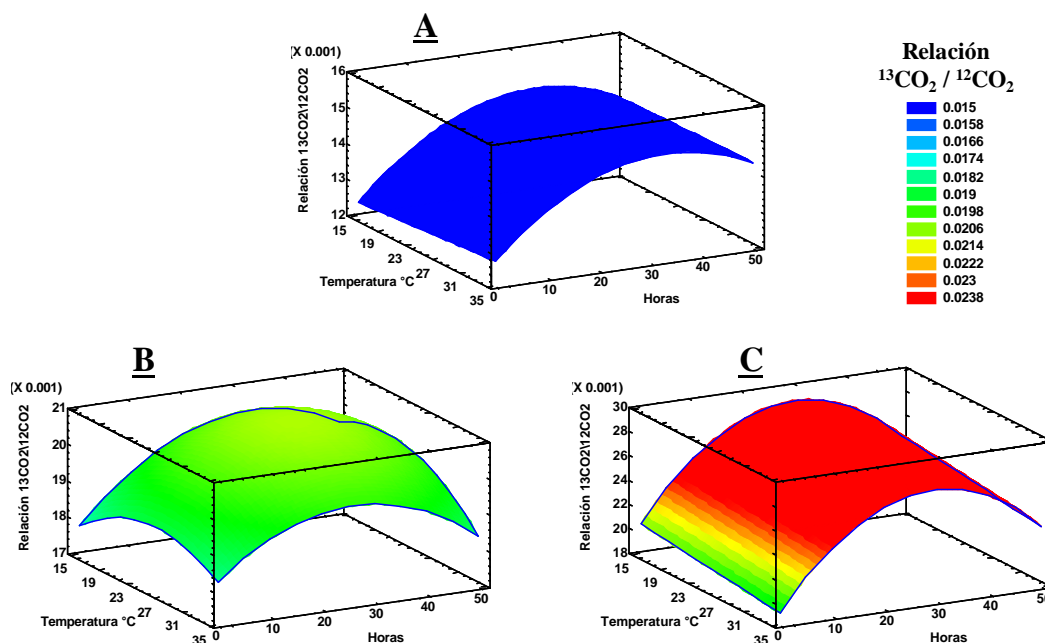


6.4.10.1 Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas - Raíz

La dinámica de los metabolitos marcados con ${}^{13}\text{CO}_2$ en la raíz en relación con el tiempo y la $T^{\circ}\text{C}$ (figura 6-21) fue altamente significativa para todos los compuestos evaluados ($P < 0.0001$) y coeficientes de determinación de 65.4, 46.6 y 50.3% para *MO*, almidón y azúcares totales, respectivamente (anexos 6-16, 6-17 y 6-18).

Independiente de la $T^{\circ}\text{C}$ evaluada, la respuesta de los metabolitos marcados en la raíz fue similar para la *MO* (figura 6-21A) y los azúcares totales (figura 6-21C) de tal manera que hubo mayor marcación a las 24 horas para luego disminuir mostrando influencia de este metabolito en los componentes totales del *MO*. Los valores de *RI* fueron similares que los obtenidos en las hojas, pero menores que los del tallo. En cuanto a los almidones (figura 6-21B) hubo mayores valores de *RI* que para el tallo y menores que para las hojas, como debería ser obvio, siendo mayores a los 25°C y menores para las otras dos $T^{\circ}\text{C}$, lo que sustenta un mejor comportamiento y mayor capacidad de almacenamiento de energía en las raíces cuando la $T^{\circ}\text{C}$ es óptima, al no alcanzar los valores del control (figuras 6-20b y 6-20c), tanto para almidones como para azúcares totales.

Figura 6-21: Modelos espaciales que describen la RI ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) en respuesta a la interacción entre $T^\circ\text{C}$ y tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ en plantas completas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo El Rosario®. Material orgánico (**A**), almidón (**B**), azúcares totales (**C**).



6.4.11 Análisis de correlación entre las variables relación isotópica ($RI - ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$), peso seco, área foliar, fotosíntesis (F) y Respiración (R).

El análisis de correlación dos a dos, por momento-producto de Pearson (anexo 6-19), entre las variables RI , peso seco, área foliar, F y R , se adelantó con el objetivo de comprender si existió una relación que pudiera explicar el movimiento de los metabolitos sintetizados (Fuente-Demanda), así como el IG y los valores obtenidos de RI en el aire de R . Dicho análisis permite afirmar que existe correlación entre las siguientes variables:

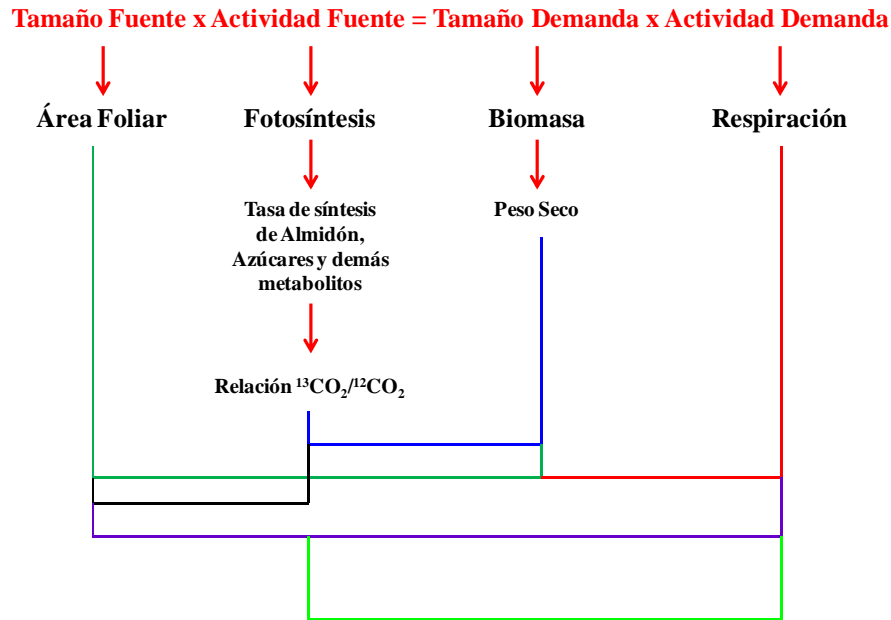
RI $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$	vs	Peso Seco (g)	(-0.1761, $P < 0.0001$)
Peso Seco (g)	vs	Área Foliar (m^2)	(0.3487, $P < 0.0001$)
Peso Seco (g)	vs	Respiración [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]	(0.0977, $P = 0.0011$)
Área Foliar (m^2)	vs	Fotosíntesis [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]	(-0.106, $P = 0.0004$)
Área Foliar (m^2)	vs	Respiración [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]	(0.3159, $P < 0.0001$)
Fotosíntesis [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]	vs	Respiración [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]	(0.2834, $P < 0.0001$)

El primer valor entre el paréntesis corresponde al coeficiente de correlación, el segundo es el valor de P . Estos permiten afirmar que se encontró correlación entre las diferentes variables medidas, las cuales están íntimamente ligadas al concepto Fuente-Demanda de asimilados.

Al acudir a la igualdad que relaciona la fuente y la demanda (Minchin y Thorpe, 1993; Stitt, 1993; Blanke, 2009; Chikov *et al.*, 2009), la figura 6-22 muestra como las variables evaluadas se relacionan de tal manera que permiten la comprensión del

fenómeno estudiado. Las variables unidas por líneas del mismo color guardan relación significativa.

Figura 6-22: Análisis de correlación dos a dos por momento-producto de Pearson, entre las variables *RI*, peso seco, área foliar, fotosíntesis y respiración, y su relación con el tamaño y actividad, tanto de la fuente como de la demanda.



6.5 Discusión

6.5.1 Comportamiento de la temperatura y variables climáticas asociadas

La *HR* mostró un comportamiento asociado al régimen de $T^\circ\text{C}$ deseado, y junto con la *RFA*, permitieron que la respuesta del *IG*, el aire respirado y la síntesis y movimiento de los asimilados fabricados por *F*, evidenciara lo que sucede en plantas completas de *Coffea arabica* L. var. Castillo[®] El Rosario, en respuesta a tres $T^\circ\text{C}$: 15°C , 35°C y 25°C ; éste último valor, según diversos autores, corresponde a la $T^\circ\text{C}$ óptima para el normal crecimiento y desarrollo del café y de especies C_3 en general (Nutman, 1937a, b, 1941; Heath y Orchard, 1957; Decker y Tio, 1959; Tio, 1962; Nunes *et al.*, 1968; Kumar y Tieszen, 1980a; Sambongi *et al.*, 1986; Meinzer *et al.*, 1990; Gómez *et al.*, 2005; DaMatta *et al.*, 2007; DaMatta *et al.*, 2008). Mantener el fitotrón abierto durante la noche y el suelo confinado en bolsa, evitó que el $^{13}\text{CO}_2$ liberado por *R* no fuera nuevamente absorbido por las plantas mediante *F*, lo que aseguró que la *RI* detectada en todas las muestras provenía de la marcación. Lo anterior además posibilitó que durante la noche se siguiera la $T^\circ\text{C}$ del ambiente, mientras en el día las plantas estuvieron bajo las condiciones del tratamiento propuesto.

6.5.2 Respuesta del intercambio gaseoso (IG) a las temperaturas evaluadas

Las tasas de F y R se afectaron por las condiciones de $T^{\circ}\text{C}$, en particular a los 15°C y 35°C . A los 15°C se obtuvieron las mayores tasas de IG, mientras a los 35°C hubo altas tasas respiratorias y las menores tasas de F a lo largo del experimento (figura 6-3B). Un balance positivo de F_n se obtuvo únicamente a los 25°C con un valor de $4598.1 \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$, mientras valores negativos se presentaron para las otras dos $T^{\circ}\text{C}$, lo que muestra que ante un régimen de $T^{\circ}\text{C}$ menor o mayor al óptimo, el desempeño fisiológico se altera, bien por una mayor actividad oxigenasa de *Rubisco* o su desnaturalización ante $T^{\circ}\text{C}$ elevadas, o por menor actividad enzimática ante bajas $T^{\circ}\text{C}$, lo que se manifestó en menor desarrollo y crecimiento (figura 6-4) (Bjorkman *et al.*, 1980; Lambers *et al.*, 1998). Es claro que las $T^{\circ}\text{C}$ del aire y foliar elevadas tienen, en el caso del cafeto, efecto sobre el IG, pues hay incrementos significativos de la fotorrespiración, lo que genera gastos excedentarios de carbono, para garantizar la estabilidad del aparato fotosintético contra la fotooxidación.

Se observó un proceso de aclimatación a los 15°C y 35°C , producto de la acumulación de azúcares en respuesta al frío (Covey-Crump *et al.*, 2002) y de la mayor actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos a elevadas $T^{\circ}\text{C}$ (Atkin y Tjoelker, 2003; Williams *et al.*, 2010) que ocurre entre 1 y 2 días posteriores a la exposición a $T^{\circ}\text{C}$ inadecuadas, mientras que a los 25°C el proceso de IG fue más regulado, que se reflejó en el balance positivo de F_n , confirmando que la $T^{\circ}\text{C}$ óptima para el desarrollo y crecimiento de *Coffea* sp. está alrededor de dicho valor (figuras 6-3 y 6-4). Es factible que la mayor R a los 35°C sea causada por factores diferentes al incremento normal de la cinética enzimática, como una mayor demanda de ATP para el mantenimiento celular por una mayor acumulación de biomasa, que se manifestó en el peso seco y el área foliar del material evaluado (anexo 6-6). Igualmente, a los 35°C se afecta la interacción entre las reacciones del metabolismo del carbono y el transporte de sustancias; esto, en conjunto con los procesos fotoquímicos en las membranas fotosintéticas, causa una rápida disminución de F (figuras 6-3, 6-4 y 6-5), en tanto a bajas $T^{\circ}\text{C}$ el factor limitante es la menor actividad carboxilasa de *Rubisco*, la cual presenta alta dependencia de la $T^{\circ}\text{C}$ para plantas de café (Riaño, 1999), debido a que la relación CO_2/O_2 disminuye (Larcher, 2003). Los mayores valores de R presentados por el material BH1247, principalmente a los 15°C y 35°C , insinúan que este genotipo es más susceptible a condiciones adversas de $T^{\circ}\text{C}$; igual, este material acumula menor materia seca en todos sus órganos, en particular en los frutos, durante su ciclo de vida (Alvarado *et al.*, 2005), que podría ser consecuencia de las mayores tasas de R observadas.

Si bien se obtuvo una F_n negativa a los 15°C , las tasas de F fueron las más altas, concordante con diversos trabajos donde $T^{\circ}\text{C}$ similares, en plantas en campo, mostraron elevadas tasas de F (López, 2004); en dichos trabajos no se tuvo en cuenta la R , que como aquí se observó, contribuyó significativamente al balance neto. En este sentido, López (2004) evaluó la F en hojas de *C. arabica* L. en tres altitudes: 1100, 1400 y 1900 m.s.n.m, con $T^{\circ}\text{C}$ promedios de 22.5 , 21.5 y 18.1°C respectivamente. Encontró valores de 3.97 , 4.51 y 4.62 , y de 4.24 , 4.41 y $5.38 \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en dos ciclos diferentes de medición, obteniendo los mayores valores de F en las $T^{\circ}\text{C}$ más bajas. Igualmente, Nutman (1937b, 1941) demostró que la F fue mayor a moderadas $T^{\circ}\text{C}$ y RFA, y menor cuando aumentaron debido al efecto de la RFA sobre la $T^{\circ}\text{C}$ foliar. Por ser el café una planta originaria de semi-sombra (Kumar y Tieszen 1980a) las $T^{\circ}\text{C}$ bajas favorecen su comportamiento fotosintético, más no el productivo, de tal

forma que hay mayor direccionamiento de los asimilados fabricados hacia los frutos en zonas de mayores $T^{\circ}C$, lo cual, además, debe estar acompañado de un régimen de precipitación óptimo (Riaño *et al.*, 2004). Lo anterior confirma que la $T^{\circ}C$ adecuada para un mejor balance entre F y R , que permita una mayor ganancia neta de CO_2 , está entre 23-27 $^{\circ}C$ (Decker y Tio, 1959; Wit, 1965; Kumar y Tieszen, 1980a; Jones, 1983; López *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2005; DaMatta *et al.*, 2007; DaMatta *et al.*, 2008). El balance positivo de F_n a los 25 $^{\circ}C$ permite asegurar que los resultados aquí presentados, en cuanto a la respuesta metabólica bajo regímenes de $T^{\circ}C$ de 15 $^{\circ}C$ y 35 $^{\circ}C$, son adecuados para entender que pasa con esta especie vegetal, bajo condiciones adversas de $T^{\circ}C$.

6.5.3 Dinámica de la RI ($^{13}CO_2/^{12}CO_2$) en el aire respirado

El metabolismo fue más lento a los 15 $^{\circ}C$, lo que se manifestó en una liberación pausada de $^{13}CO_2$ hasta las 68 horas posteriores a la marcación, que indica un metabolismo menos exigente en energía para construcción y mantenimiento de la biomasa presente. Pasaron 40 horas para detectar en el aire de R parte del $^{13}CO_2$ suministrado por F . Antes de las 40 horas los valores fueron iguales al control y el incremento posterior puede ser reflejo de aclimatación. La respuesta del aire de respiración a los 35 $^{\circ}C$ dió una idea de la rapidez con que el metabolismo funciona, ya que las altas exigencias energéticas, tanto para el crecimiento celular, como para el mantenimiento de la biomasa, y para una mejor refrigeración del sistema por transpiración, hicieron del metabolismo un proceso de mayor consumo de energía. Aún hasta el final del experimento se encontraba al interior celular parte del $^{13}CO_2$ que ingresó por F , ya que los modelos presentados no alcanzaron los valores del control. A 25 $^{\circ}C$ el metabolismo fue dinámico al iniciar con la degradación de metabolitos recién marcados, luego utilizó compuestos previamente almacenados (sin marcar), para utilizar nuevamente compuestos marcados, como reflejo de los ciclos día-noche y del comportamiento normal del metabolismo bajo esta $T^{\circ}C$. En este sentido, y usando RI natural, Helle y Schleser (2004) y Kagawa *et al.* (2005) estudiaron la variación estacional del almidón en hojas de árboles, la cual reflejó las condiciones ambientales de ciclos cortos de tiempo, y encontraron que parte del almidón utilizado había sido previamente almacenado, mientras el restante era almidón recientemente sintetizado y marcado con $^{13}CO_2$ (figura 6-7).

El mayor valor de RI en el aire respirado del genotipo *BH1247* ($P=0.038$), podría ayudar a comprender por qué este material, a pesar de hacer parte del mismo componente de la variedad Castillo El Rosario[®], acumula menos biomasa a lo largo de su ciclo de vida, incluso en los frutos, al producir 32.9% menos que el genotipo *CX2178*, con respecto a la variedad Colombia (Alvarado *et al.*, 2005). Similar comportamiento se presentó en las mediciones de R bajo la metodología de *IG*.

Se observó en las tres $T^{\circ}C$ que, casi tres días después de aplicado el $^{13}CO_2$, aún quedaron compuestos que fueron marcados inicialmente y que aún hacen parte de la dinámica del metabolismo, ya que los valores de RI no llegaron al nivel del control, de tal manera que una vez formados por F pasan a ser parte de las reservas de la planta bien sea para almacenamiento como almidón (en hojas, tallos o raíces), como azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) para ser enviados a los órganos vertederos y ayudar a su construcción y mantenimiento, como otros compuestos fundamentales del sistema

(proteínas, lípidos y celulosa) o bien como parte del metabolismo secundario de la planta.

6.5.4 Cuantificación de los metabolitos analizados

La cuantificación de los compuestos reflejó lo que bajo condiciones normales de desarrollo y crecimiento se presenta en las diferentes especies vegetales, especialmente aquellas con metabolismo C_3 . Se encontraron diferencias estadísticas significativas en la cantidad de almidones, con mayores valores para el tallo, seguidos de las hojas y las raíces (figura 6-10). Este comportamiento es normal pues para la edad de las plantas, las cuales se encontraban en las etapas iniciales de crecimiento vegetativo, los tallos tienen un porcentaje alto de tejido no lignificado, lo cual les permite contar con los organelos necesarios tanto para realizar F como para importar carbohidratos desde las hojas, en forma de sacarosa, glucosa o fructosa, y almacenarlos como almidón en los cloroplastos. En diferentes especies, fundamentalmente arbustos y maderables, los tallos son importantes órganos de reserva (Lambers *et al.*, 1998; Larcher, 2003). De la misma manera hubo mayor cuantificación del metabolito a los 35°C, seguido por 25°C y 15°C respectivamente, que refleja el mayor gasto energético asociado a esta $T^\circ C$ con el fin de cumplir con las exigencias de acumulación de biomasa y requerimientos respiratorios previamente discutidos (figura 6-10). La menor cuantificación a los 15°C podría ser normal, pues bajas $T^\circ C$ se asocian a un metabolismo más lento, como se reflejó en el aire respirado de la figura 6-7. No encontrar diferencias en la cuantificación de este metabolito entre tratamientos permite asegurar que no hubo alteración metabólica por efecto de la marcación con $^{13}CO_2$.

Los mayores valores de azúcares totales encontrados en las hojas frente a los tallos y las raíces, coincide con diversos reportes, pues es en las hojas donde a través del proceso fotosintético los azúcares son los primeros compuestos sintetizados a partir de las hexosas y TP , los cuales dependiendo del estado de la planta y del balance Fuente-Demanda de sus órganos, son enviados a los cloroplastos para almacenar energía en forma de almidón, o pueden ser cargados en las células del floema y exportados, de acuerdo con las exigencias energéticas de los vertederos, o utilizados en el proceso respiratorio (Battistelli *et al.*, 1991; Foyer y Galtier, 1996; Sasaki *et al.*, 2005).

Similar al almidón, la mayor cantidad de azúcares totales se observó a los 35°C, lo que respalda el comportamiento encontrado en ambos metabolitos para esta $T^\circ C$ (figura 6-11). Sería importante profundizar en posteriores estudios el por qué se encontró mayor cantidad de glucosa y fructosa que de sacarosa en tallos y raíces (figura 6-12), pues ha sido bien fundamentado que el principal carbohidrato de transporte a través del tallo es la sacarosa por ser un azúcar no reductor, contrario a los otros dos compuestos reductores, lo que les infiere mayores posibilidades de ser metabolizados en el tallo, con altas posibilidades de no llegar a su destino (Sasaki *et al.*, 2005).

La mayor presencia de ácido linolénico en el genotipo *CX2178* y de ácido esteárico en el material *BH1247* bien podrían ser tenidos en cuenta en estudios posteriores del metabolismo en *Coffea* sp. como factores preponderantes en la acumulación de biomasa o demás procesos metabólicos (figura 6-13). Si bien no se encontraron diferencias estadísticas en ninguno de los factores analizados para las proteínas (figura 6-14) y la celulosa (figura 6-15), es importante destacar los mayores valores hallados a

los 35°C para ambos compuestos, lo que permite afianzar lo que previamente se ha discutido para ésta $T^{\circ}C$.

6.5.5 Comportamiento de la relación isotópica ($RI - {}^{13}CO_2/{}^{12}CO_2$) en los diferentes metabolitos y órganos analizados

La información obtenida en el presente experimento refleja cómo, de acuerdo con las necesidades metabólicas y energéticas de plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo El Rosario® genotipos *BH1247* y *CX2178*, responden a diferentes regímenes de $T^{\circ}C$, las cuales afectan en mayor o menor grado el comportamiento de los principales compuestos del metabolismo bioquímico de las plantas.

La disminución de los valores de RI del MO , almidones y azúcares totales foliares en el tiempo (figuras 6-16a, b y c), reflejan la exportación de compuestos marcados hacia órganos de demanda, como tallos (figuras 6-18a, b y c) y raíces (figuras 6-20a, b y c).

Los valores iguales de RI en el almidón foliar a los 35°C, para las hojas marcadas y control hacia el final del experimento, son una evidencia de la elevada velocidad metabólica bajo altas $T^{\circ}C$ (figura 6-16b), en tanto a los 15°C fueron diferentes entre tratamientos, que muestra un metabolismo más lento y menos exigente energéticamente (figura 6-16b), en tanto a los 25°C hay un equilibrio en el metabolismo, de tal forma que parte del almidón es hidrolizado hacia compuestos de transporte como sacarosa, y otra parte se mantiene como energía almacenada.

El movimiento de ${}^{13}CO_2$ en respuesta a la $T^{\circ}C$ y al tiempo posterior a la marcación, principalmente para el MO y los azúcares tuvo un comportamiento similar, indicando la importancia de los azúcares no estructurales en el metabolismo total de la planta, y como, independiente de la $T^{\circ}C$, disminuyen paulatinamente debido a su exportación hacia tallos y raíces. El comportamiento diferencial de los almidones frente a los azúcares, de acuerdo con la $T^{\circ}C$, mostró que a los 15°C, $T^{\circ}C$ que presentó los mayores valores de RI desde el inicio del experimento, una rápida degradación hasta las 48 horas, coincidente con los reportes de Venema *et al.* (1999), Strand *et al.* (1999) y Lu y Sharkey (2006), quienes sugieren que bajas $T^{\circ}C$ pueden causar mayor síntesis de almidón en los cloroplastos. Puede ser lógico pensar que las menores necesidades energéticas a $T^{\circ}C$ bajo el óptimo fisiológico, causen acumulación de almidón en las hojas, mientras que a $T^{\circ}C$ mayores, por efecto de un metabolismo más exigente energéticamente, las hexosas y TP sean dirigidas a la síntesis de azúcares, para ser rápidamente enviados a los tejidos de demanda y suplir además las exigencias respiratorias y fotorespiratorias (figuras 6-17a, b y c).

La síntesis de lípidos y celulosa (figuras 6-16d y 6-16f) fue más dinámica a los 25°C y 35°C producto de mejores condiciones de $T^{\circ}C$ para un metabolismo bioquímico más activo. Con el tiempo se observó marcación superior de ambos metabolitos, en particular celulosa, ya que se sabe que un alto porcentaje del metabolismo del carbono se direcciona a la formación de componentes de pared celular, asociados con la expansión celular y el crecimiento (Damesin y Lelarge, 2003). En la figura 6-17D se observó mayor marcación de los lípidos que de celulosa y proteínas, y a su vez mayor marcación a los 35°C con el tiempo, que puede indicar mayor síntesis del compuesto por efecto de mayores exigencias energéticas a elevadas $T^{\circ}C$, así como el

mantenimiento de la homeostasis del sistema, con el fin de mantener las membranas celulares bajo condiciones fisiológicas adecuadas de resistencia, flexibilidad y fluidez, de tal manera que permitió el movimiento de los compuestos sintetizados, de acuerdo con los requerimientos de la fuente y la demanda (Kaplan y Guy, 2004; Lu y Sharkey, 2006).

La no detección de proteínas marcadas sugiere que este componente del metabolismo requiere mayor tiempo para que las cadenas carbonadas se incorporen en su síntesis, por lo cual en la presente determinación su presencia fue muy baja o nula. El mayor valor cuantificado a los 35°C puede ser un indicativo de mayor síntesis por efecto de la $T^{\circ}C$, en la formación de proteínas de choque térmico (Taiz y Zeiger, 2002).

La dinámica del *MO*, almidones y azúcares totales en el tallo a los 25°C, el cual fue continuo, da una idea de las mejores condiciones de $T^{\circ}C$ para que las plantas continúen un eficiente y regulado proceso de importación de asimilados. Igualmente, en este órgano hubo mayor marcación de los azúcares totales con respecto a los almidones, como quiera que es un órgano de transporte entre la fuente y la demanda, y conecta las hojas con las raíces a través de los vasos conductores del floema.

Así como se observó para el tallo, la *RI* de los metabolitos medidos en las raíces reflejó un comportamiento típico de demanda de asimilados. Fue notorio que a las 1.5 horas posteriores a la marcación con $^{13}CO_2$ aún no se encontraron metabolitos marcados, ya que sus valores fueron iguales al control. Posteriormente hubo un incremento sostenido hasta las 48 horas para los 25°C, fundamentalmente en los azúcares totales, mientras a los 35°C al final del experimento cayó al nivel del control, lo cual da una idea del mayor gasto energético también en las raíces bajo esta $T^{\circ}C$. La mayor acumulación de almidón marcado en las raíces con respecto al tallo evidenció su función vertedero y de órgano de reserva energética, así como los mayores valores de *RI* de los azúcares totales marcados en el tallo con respecto a las raíces, evidencia la función vertedero y de transporte de los asimilados fabricados en las hojas, los que son fundamentalmente exportados hacia las raíces.

En general, y como se observó en la figura 6-22, tanto el tamaño como la actividad de la fuente y la demanda, medidos y cuantificados a través de las diferentes variables experimentales, respondieron en concordancia con diversos resultados discutidos en la literatura, los cuales muestran la fuerte interacción que existe entre los diferentes órganos de los vegetales y su estrecha relación con los diversos procesos fisiológicos que rigen la síntesis, importación y exportación de asimilados, de acuerdo con el estado de crecimiento, desarrollo y fenología de los vegetales (Minchin y Thorpe, 1993; Stitt, 1993; Blanke, 2009; Chikov *et al.*, 2009).

6.6 Conclusiones

- A través de la metodología de marcación con $^{13}CO_2$ enriquecido se logró hacer seguimiento a los principales compuestos sintetizados por los vegetales, y su respuesta a diferentes condiciones de temperatura, en plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo® El Rosario.

- Los procesos de intercambio gaseoso, así como la importación y exportación de asimilados se ven favorecidos a temperaturas de 25°C en *Coffea arabica* L. var. Castillo® El Rosario. El metabolismo bioquímico y de intercambio gaseoso es más lento a los 15°C, y las exigencias energéticas de las plantas son mayores a los 35°C, lo que causa un desbalance en el vegetal.
- El comportamiento de los azúcares totales, particularmente sacarosa, glucosa y fructosa, mostró su importancia como el principal metabolito de transporte de energía y de regulación de la relación Fuente-Demanda en *Coffea arabica* L. var. Castillo® El Rosario.
- Los mayores valores observados para el genotipo CX2178 frente al BH1247 en algunas variables de respuesta pueden estar relacionados con su mayor acumulación de materia seca y producción a lo largo de su ciclo productivo.

6.7 Bibliografía

Alégre, G. 1959. Climats et caféirs d'Arabies. L'Agronomie Tropicale. Francia. 14(1):23-58.

Alvarado A., G.; Posada S., H.E.; Cortina G., H.A.; Duque O., H.; Baldión R., J.V.; Guzmán M., O. 2005. La Variedad Castillo El Rosario® para las regiones cafeteras de Antioquia, Risaralda y Caldas. Avances Técnicos Cenicafé (Colombia) No. 340:1-8.

Arcila P, J. 1987. Métodos prácticos para medición del área foliar del cafeto. Diseño de una reglilla para medición del área foliar en el campo. *In*: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé. Chinchiná (Colombia). Informe anual de labores de la Disciplina de Fisiología Vegetal. 1986-1987. Chinchiná, Cenicafé.

Atkin, O.K.; Tjoelker, M.G. 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. Trends Plant Science 8:343-351.

Bjorkman, O; Badger, M.R. Armond, P.A. 1980. Response and adaptation of photosynthesis to high temperatures. *In*: Adaptation of plants to water and high temperatures stress, N.C. Turner and P.J. Kramer, eds., Wiley, New York, pp. 233-249.

Battistelli, A.; Adcok, M.D.; Leegood, C. 1991. The relationship between the activation state of sucrose-phosphate synthase and the rate of CO₂ assimilation in spinach leaves. Planta 183:620-622.

Blanke, M.M. 2009. Regulatory mechanisms in source sink relationship in plants – A review. Acta Horticulturae 835:13-20.

Bollag, D.M.; Rozycki, M.D.; Edelstein, S.J. 1996. Protein Methods. Second Ed. Wiley-Liss Inc. 894 p.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Chikov, V.I.; Abdrakhimov, F.A.; Bakirova, G.G.; Batasheva, S.N. 2009. The role of Sink-Source relationships between different organs in regulation of photosynthesis and productivity. *Acta Horticulturae* 835:87-98.

Covey-Crump, E.M.; Attwood, R.G.; Atkin, O.K. 2002. Regulation of root respiration in two species of *Plantago* that differ in relative growth rate: the effect of short- and long term changes in temperature. *Plant Cell Environment* 25:1501-1513.

DaMatta, F.M.; Ronchi, C.P.; Maestri, M.; Barros, R.S. 2007. Ecophysiology of coffee growth and production. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19(4):485-510.

DaMatta, F.M.; Cunha, R.L.; Antunes, W.C.; Martins, S.C.V.; Araujo, W.L.; Fernie, A.R.; Moraes, G. A. B. K. 2008. In field-grown coffee trees source-sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytologist* 178:348-357.

Damesin, C.; Lelarge, C. 2003. Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant Cell and Environ.* 26:207-219.

Decker, J.P.; Tio, M.A. 1959. Photosynthetic surges in coffee seedlings. *En: Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, Puerto Rico* 43(1):50-55.

Fedecafé. 2012. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe. Disciplina de Agroclimatología, Archivos Climáticos, Chinchiná, Caldas, Colombia.

Foyer, C.H.; Galtier, N. 1996. Source-Sink interaction and communication in leaves. *In: Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships.* Zamski, E.; Schaffer, A.A. eds. pp. 311-340.

Gómez G., L.F.; López R., J.C.; Riaño H., N.M.; López F., Y.; Montoya R., E.C. 2005. Diurnal changes in leaf gas exchange and validation of a mathematical model for coffee (*Coffea Arabica* L.) canopy photosynthesis. *Photosynthetica (Checoslovaquia)* 43(4):575-582.

Heath, O.V.S.; Orchard, B. 1957. Midday closure of stomata. Temperature effects on the minimum intercellular space carbon dioxide concentration. *Nature* 180(4578):180-182.

Helle, G.; Schleser, G.H. 2004. Beyond CO₂-fixation by Rubisco - an interpretation of ¹³C/¹²C variations in tree rings from novel intra-seasonal studies on broad-leaf trees. *Plant, Cell and Environment* 27:367-380.

Holdridge, L.R. 1987. Ecología basada en zonas de vida. San José (Costa Rica), IICA. 216 p.

Hopkins, W.G.; Hüner, N.P.A. 2004. Introduction to Plant Physiology. 3rd Edition. New York (Estados Unidos), John Wiley and Sons. 560p.

Jones, H.G. 1983. Plants and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge, Cambridge University Press. 323 p.

Kagawa, A.; Sugimoto, A.; Yamashita, K.; Abe, H. 2005. Temporal photosynthetic carbon isotope signatures revealed in a tree ring through $^{13}\text{CO}_2$ pulse-labelling. *Plant, Cell and Environment* 28:906-915.

Kaplan, F.; Guy, C.L. 2004. β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* 135:1674-1684.

Kaplan, F.; Sung, D.Y.; Guy, Ch.L. 2006. Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum* 126:120-128.

Kumar, D.; Tieszen, L.L. 1980a. Photosynthesis in *Coffea arabica* L. I: Effects of light and temperature. *Experimental Agriculture* 16(1):13-19.

Kumar, D.; Tieszen, L.L. 1980b. Photosynthesis in *Coffea arabica* L. I: Effects of light and temperature. *En: Experimental Agriculture* 16(1):21-27.

Lambers, H.; Chapin III, F.S.; Pons, T.L. 1998. Plant Physiological Ecology. New York (Estados Unidos), Springer. 540 p.

Larcher, W. 2003. Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Fourth edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 513 p.

López R., J.C.; Riaño H., N.M.; López F., Y. 1999. Comportamiento fotosintético diario de la hoja del cafeto *Coffea arabica* L. cv. Colombia. Chinchiná (Colombia), Cenicafé. 12 p.

López R., J.C. 2004. Comportamiento del intercambio gaseoso de *Coffea arabica* L. en tres altitudes de la zona cafetera central colombiana. *Cenicafé (Colombia)* 55(3):202-212.

Lu, Y.; Sharkey, T.D. 2006. The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell and Environment* 29:353-366.

Meinzer, F.C.; Goldstein, G.; Grantz, D.A. 1990. Carbon isotope discrimination in coffee genotypes grown under limited water supply. *En: Plant Physiology* 92:130-135.

Minchin, P.E.H.; Thorpe, M.R. 1993. Sink strength: a misnomer and best forgotten. *Plant, Cell and Environment* 16:1039-1040.

Nunes, M.A.; Bierhuizen, J.F.; Ploegman, C. 1968. Estudos sobre a produtividade do cafeeiro. I: Efeito da luz, temperatura e concentração de CO_2 na fotossíntese de *Coffea arabica* L. *Acta Botánica Neerlandica* 17:93-102.

Nutman, F.J. 1937a. Bearing of recent physiological research on the shade problem of arabica coffee cultivation. *East African Agricultural and Forestry Journal* 2:366-370.

Nutman, F.J. 1937b. Studies of the physiology of *Coffea arabica* L. I. Photosynthesis of coffee leaves under natural conditions. *Annals of Botany* 3:353-367.

Nutman, F.J. 1941. Studies of the physiology of *Coffea arabica* L. III: Transpiration rates of whole trees in relation to natural environmental conditions. *Annals of Botany* 5:59-81.

Riaño H., N.M. 1991. Productividad del cafeto. Variabilidad genotípica de la actividad fotosintética. *En: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CENICAFÉ. CHINCHINÁ (COLOMBIA). Informe anual de labores de la Disciplina de Fisiología Vegetal. 1990-1991. Chinchiná: CENICAFÉ. p. 55-58.*

Riaño H., N.M. 1999. Estudio de la interacción intensidad lumínica - dosis de Nitrógeno, sobre el comportamiento de Ribulosa 1,5 bifsato carboxilasa - oxigenasa (*Rubisco*), nitrato reductasa (*NR*), Nitrógeno e intercambio gaseoso en la planta de café *Coffea arabica* L. Bogotá (Colombia), Universidad Nacional. Facultad de Ciencias. 133 p.

Riaño H., N.M.; Arcila P., J.; Jaramillo R., A.; Cháves C., B. 2004. Acumulación de materia seca y extracción de nutrimentos por *Coffea arabica* L. cv. Colombia en tres localidades de la zona cafetera central. *Cenicafé (Colombia)* 55(4):265-276.

Sambongi, K., Yasuda, T.; Yamaguchi, T. 1986. Effect of shading on photosynthesis of *Coffea arabica* L. *Japanese Journal of Tropical Agriculture, Japón.* 30:149-152.

Sasaki, H.; Edo, E.; Uehara, N.; Ishimaru, T.; Kawamitsu, Y.; Suganuma, S.; Ueda, D.; Ohsugi, R. 2005. Effect of sucrose on activity of starch synthesis enzymes in rice ears in culture. *Physiologia Plantarum* 124:301-310.

Stitt, M. 1993. Sink strength: integrated systems need integrating approaches. *Plant Cell and Environment* 16:1041-1043.

Strand Å., Hurry V., Henkes S., Huner N., Gustafsson P., Gardeström P. & Stitt M. 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology* 119, 1387-1397.

Taiz, L.; Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. 3rd Edition. Sunderland (Estados Unidos), Sinauer Associates. 690 p.

Tio, M.A. 1962. Effect of light intensity on the rate of apparent photosynthesis in coffee leaves. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, Puerto Rico.* 46(3):159-166.

Venema, J.H.; Posthumus, F.; de Vries, M.; van Hasselt, P.R. 1999. Differential response of domestic and wild *Lycopersicon* species to chilling under low light: growth, carbohydrate content, photosynthesis and the xanthophyll cycle. *Physiologia Plantarum* 105:81-88.

Wanek, W.; Heintel, S.; Richter, A. 2001. Preparation of starch and other carbon fractions from higher plant leaves for stable carbon isotope analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15:1136-1140.

Williams, T.C.R.; Poolman, M.G.; Howden, A.J.M.; Schwarzlander, M.; Fell, D.A.; Ratcliffe, R.G.; Sweetlove, L.J. 2010. A Genome-Scale metabolic model accurately predicts fluxes in central carbon metabolism under stress conditions. *Plant Physiology* 154:311-323.

Wit, C.T. de. 1965. Photosynthesis of leaf canopies. Wageningen, Holanda: Centre for Agricultural Publishing and Documentation. 57 p.

Yamaguchi, T.; Friend, D.J.C. 1979. Effect of leaf age and irradiance on photosynthesis of *Coffea arabica* L. *En: Photosynthetica, Checoslovaquia*. 13(39:271-278).

Yano, R.; Nakamura, M.; Yoneyama, T.; Nishida, I. 2005. Starch related α -glucan/water dikinase is involved in the cold-induced development of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138:837-846.

Zelitch, I. 1971. Photosynthesis, photorespiration and plant productivity. Nueva York, Estados Unidos: Academic Press. p. 1-154.

6-A. Anexos

Anexo 6-1

FOTOSÍNTESIS EN PLANTAS COMPLETAS

Tabla ANOVA para Fotosíntesis [$\mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] por Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	7.55764E11	2	3.77882E11	3095.11	0.0000
Intra grupos	1.35398E11	1109	1.2209E8		
Total (Corr.)	8.91163E11	1111			

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Temperatura °C</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
35	274	5246.95	C
25	424	36078.1	B
15	414	71928.0	A

RESPIRACIÓN EN PLANTAS COMPLETAS

Tabla ANOVA para Respiración [$\mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] por Temperatura $^{\circ}\text{C}$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1.38321E12	2	6.91604E11	636.45	0.0000
Intra grupos	1.35616E12	1248	1.08667E9		
Total (Corr.)	2.73937E12	1250			

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Temperatura °C</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
35	413	-111308.0	C
15	414	-84302.0	B
25	424	-31480.0	A

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACIÓN EN PLANTAS COMPLETAS

Correlaciones

	Fotosíntesis [$\mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]	Respiración [$\mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]
Fotosíntesis [$\mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]		0.2834
		(1112)
		0.0000
Respiración [$\mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]	0.2834	
	(1112)	
	0.0000	

Anexo 6-2

DIFERENCIAS EN LA RELACIÓN $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ENTRE PLANTAS MARCADAS Y CONTROL

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.0208857	20	0.00104428	142.56	0.0000
Residuo	0.0090099	1230	0.00000732512		
Total (Corr.)	0.0298956	1250			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamiento	0.00033523	1	0.00033523	45.76	0.0000
Metabolito	0.011833	5	0.0023666	323.08	0.0000
Temperatura	0.0000406746	1	0.0000406746	5.55	0.0185
Tiempo	0.000049555	1	0.000049555	6.77	0.0093
Temp.*Temp.	0.0000289245	1	0.0000289245	3.95	0.0469
Tiempo*Temp.	0.0000407524	1	0.0000407524	5.56	0.0183
Tiempo*Temp.*Temp.	0.000033738	1	0.000033738	4.61	0.0319
Tratamiento*Órgano	0.00109257	2	0.000546284	74.58	0.0000
Tratamiento*Metabolito	0.00271903	5	0.000543807	74.24	0.0000
Residuo	0.0090099	1230	0.00000732512		
Total (corregido)	0.0298956	1250			

Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

<i>Tto</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Testigo	622	0.0151417	0.00018737	B
Marcadas	629	0.0166099	0.000186725	A

R-Cuadrada = 69.8621 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 69.372 porciento

Error estándar del est. = 0.0027065

Error medio absoluto = 0.00172397

Estadístico Durbin-Watson = 1.00059 (P=0.0000)

Anexo 6-3

DIFERENCIAS ENTRE GENOTIPOS PARA AIRE RESPIRADO

Genotipo BH1247

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 1

A=Genotipo

Número de Factores Cuantitativos: 2

B=Temperatura

C=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.00605923	7	0.000865604	76.28	0.0000
Residuo	0.00137304	121	0.0000113475		
Total (Corr.)	0.00743228	128			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Genotipo	0.0000499615	1	0.0000499615	4.40	0.0380
Temperatura	0.0000273407	1	0.0000273407	2.41	0.1232
Horas	0.000011978	1	0.000011978	1.06	0.3063
Temperatura*Horas	0.000148584	1	0.000148584	13.09	0.0004
Horas*Horas	0.000017365	1	0.000017365	1.53	0.2185
Temperatura*Temperatura	0.00025875	1	0.00025875	22.80	0.0000
Temperatura*Horas*Horas	0.0000138027	1	0.0000138027	1.22	0.2723
Residuo	0.00137304	121	0.0000113475		
Total (corregido)	0.00743228	128			

R-Cuadrada = 81.5259 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 80.4572 porciento

Error estándar del est. = 0.0033686

Error medio absoluto = 0.00253763

Estadístico Durbin-Watson = 0.831042 (P=0.0000)

Genotipo CX2178

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 1

A=Genotipo

Número de factores cuantitativos: 2

B=Temperatura

C=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.00605923	7	0.000865604	76.28	0.0000
Residuo	0.00137304	121	0.0000113475		
Total (Corr.)	0.00743228	128			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Genotipo	0.0000499615	1	0.0000499615	4.40	0.0380
Temperatura	0.0000273407	1	0.0000273407	2.41	0.1232
Horas	0.000011978	1	0.000011978	1.06	0.3063
Temperatura*Horas	0.000148584	1	0.000148584	13.09	0.0004
Horas*Horas	0.000017365	1	0.000017365	1.53	0.2185
Temperatura*Temperatura	0.00025875	1	0.00025875	22.80	0.0000
Temperatura*Horas*Horas	0.0000138027	1	0.0000138027	1.22	0.2723
Residuo	0.00137304	121	0.0000113475		
Total (corregido)	0.00743228	128			

R-Cuadrada = 81.5259 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 80.4572 por ciento

Error estándar del est. = 0.0033686

Error medio absoluto = 0.00253763

Estadístico Durbin-Watson = 0.831042 (P=0.0000)

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 = 0.0022651 + 0.00062349 \cdot \text{II}(1) + 0.00061889 \cdot \text{Temperatura} + 0.000348644 \cdot \text{Horas} - 0.0000463939 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Horas} + 0.00000494027 \cdot \text{Horas}^2 + 0.0000300939 \cdot \text{Temperatura}^2 + 1.65605\text{E-}7 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Horas}^2$$

en donde:

II(1) = 1 si Genotipo=BH1247, -1 si Genotipo=CX2178, 0 de lo contrario

Anexo 6-4

DIFERENCIAS EN LA RELACIÓN $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ENTRE METABOLITOS

Variable Dependiente: Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Factores:

Metabolito
Temperatura (°C)
Tratamiento
Horas
Órgano

Covariantes:

Peso Seco (g)
Área Foliar (m²)

Número de casos completos: 1251

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Covariables					
Peso seco	0.00002261	1	0.00002261	2.35	0.1253
Area Foliar	0.00000160895	1	0.00000160895	0.17	0.6826
Efectos Principales					
A : Metabolito	0.0120264	5	0.00240528	249.95	0.0000
B : Temperatura (°C)	0.0000768341	2	0.000038417	3.99	0.0187
C : Tratamiento	0.00453909	1	0.00453909	471.69	0.0000
D : Horas	0.0000582111	2	0.0000291056	3.02	0.0489
E : Órgano	0.0000194561	2	0.00000972805	1.01	0.3642
Residuos	0.0118942	1236	0.00000962312		
Total (Corregido)	0.0298956	1250			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 6-5

ANAVA PESO SECO TOTAL PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 3

A = Temperatura

B = Genotipo

C = Tratamiento

Número de Factores Cuantitativos: 0

Análisis de Varianza para Peso Seco

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	10.6701	4	2.66752	3.68	0.0077
Residuo	72.4347	100	0.724347		
Total (Corr.)	83.1047	104			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	8.23478	2	4.11739	5.68	0.0046
Genotipo	1.06106	1	1.06106	1.46	0.2290
Tratamiento	1.76438	1	1.76438	2.44	0.1218
Residuo	72.4347	100	0.724347		
Total (corregido)	83.1047	104			

R-Cuadrada = 12.8393 porciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 9.35291 porciento

Error estándar del est. = 0.851086

Error medio absoluto = 0.654905

Estadístico Durbin-Watson = 2.07601 (P=0.6505)

Tabla de Medias de Mínimos Cuadrados para Peso Seco con intervalos de confianza del 95.0 %

<i>Nivel</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Media General	105	3.66973	0.0831528	3.50476	3.8347
Temperatura					
15	35	3.63117	0.1439	3.34568	3.91667
25	36	4.03011	0.141848	3.74869	4.31153
35	34	3.34791	0.146129	3.05799	3.63782
Genotipo					
BH1247	51	3.56909	0.119347	3.33231	3.80587
CX2178	54	3.77037	0.115818	3.54059	4.00015
Tratamiento					
Marcadas	54	3.79951	0.115818	3.56973	4.02929
Testigo	51	3.53995	0.119347	3.30317	3.77673

Comparaciones Múltiples para Peso Seco por Temperatura

Método: 95.0 porciento Duncan

<i>Temperatura</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
35	34	3.34791	0.146129	B
15	35	3.63117	0.1439	BA
25	36	4.03011	0.141848	A

Anexo 6-6

ANAVA ÁREA FOLIAR PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 3

A = Temperatura

B = Genotipo

C = Tratamiento

Número de Factores Cuantitativos: 0

Análisis de Varianza para Área Foliar

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.00458513	4	0.00114628	10.40	0.0000
Residuo	0.0110207	100	0.000110207		
Total (Corr.)	0.0156058	104			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	0.00443572	2	0.00221786	20.12	0.0000
Genotipo	0.000135972	1	0.000135972	1.23	0.2693
Tratamiento	0.0000665525	1	0.0000665525	0.60	0.4389
Residuo	0.0110207	100	0.000110207		
Total (corregido)	0.0156058	104			

R-Cuadrada = 29.3809 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 26.5561 porciento

Error estándar del est. = 0.0104979

Error medio absoluto = 0.00824475

Estadístico Durbin-Watson = 2.33088 (P=0.9549)

Tabla de Medias de Mínimos Cuadrados para Área Foliar con intervalos de confianza del 95.0 %

<i>Nivel</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Media General	105	0.0542041	0.00102567	0.0521692	0.056239
Temperatura					
15	35	0.0489012	0.00177498	0.0453797	0.0524228
25	36	0.0632878	0.00174966	0.0598165	0.0667591
35	34	0.0504232	0.00180246	0.0468471	0.0539992
Genotipo					
BH1247	51	0.0530648	0.00147212	0.0501441	0.0559854
CX2178	54	0.0553433	0.00142859	0.052509	0.0581776
Tratamiento					
Marcadas	54	0.0550011	0.00142859	0.0521668	0.0578354
Testigo	51	0.053407	0.00147212	0.0504864	0.0563277

Comparaciones Múltiples para Área Foliar por Temperatura

Método: 95.0 porciento Duncan

<i>Temperatura</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
15	35	0.0489012	0.00177498	B
35	34	0.0504232	0.00180246	B
25	36	0.0632878	0.00174966	A

Anexo 6-7

ANAVA *RI* EN EL MATERIAL ORGÁNICO DE HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Hojas"; Metabolito = "Material Orgánico"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.000147232	2	0.0000736159	33.20	0.0000
Residuo	0.00011309	51	0.00000221745		
Total (Corr.)	0.000260322	53			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	0.00000924794	1	0.00000924794	4.17	0.0463
Horas	0.000137984	1	0.000137984	62.23	0.0000
Residuo	0.00011309	51	0.00000221745		
Total (corregido)	0.000260322	53			

R-Cuadrada = 56.5576 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 54.854 por ciento

Error estándar del est. = 0.00148911

Error medio absoluto = 0.00117206

Estadístico Durbin-Watson = 2.02863 (P=0.4554)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0212229	0.000698308	0.019821	0.0226248
Temperatura °C	-0.000050684	0.0000248185	-0.000100509	-8.58673E-7
Horas	-0.000081574	0.0000103411	-0.000102335	-0.0000608134

La ecuación del modelo ajustado es:

Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ *MO* = 0.0212229 - 0.000050684*Temperatura - 0.000081574*Horas

Anexo 6-8

ANAVA *RI* EN EL ALMIDÓN EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Hojas"; Metabolito = "Almidón"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.000979853	5	0.000195971	14.39	0.0000
Residuo	0.000653531	48	0.0000136152		
Total (Corr.)	0.00163338	53			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	0.000200319	1	0.000200319	14.71	0.0004
Horas	0.000268763	1	0.000268763	19.74	0.0001
Temperatura*Horas	0.00020022	1	0.00020022	14.71	0.0004
Temperatura*Temperatura °C	0.000142326	1	0.000142326	10.45	0.0022
Horas*Temperatura*Temperatura	0.00017404	1	0.00017404	12.78	0.0008
Residuo	0.000653531	48	0.0000136152		
Total (corregido)	0.00163338	53			

R-Cuadrada = 59.9891 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 55.8213 por ciento

Error estándar del est. = 0.00368988

Error medio absoluto = 0.00273099

Estadístico Durbin-Watson = 1.90791 (P=0.1782)

Límites de confianza del 95.0% para los Coeficientes Estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0700798	0.00974494	0.0504862	0.0896733
Temperatura	-0.00325152	0.000847692	-0.00495592	-0.00154712
Horas	-0.00139738	0.000314517	-0.00202976	-0.000765005
Temperatura*Horas	0.000104916	0.0000273591	0.0000499071	0.000159926
Temperatura ²	0.0000544529	0.0000168419	0.0000205899	0.000083159
Horas*Temperatura ²	-0.00000194343	5.43571E-7	-0.00000303635	-8.50501E-7

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Almidón} = 0.0700798 - 0.00325152 * \text{Temperatura} - 0.00139738 * \text{Horas} + 0.000104916 * \text{Temperatura} * \text{Horas} + 0.0000544529 * \text{Temperatura}^2 - 0.00000194343 * \text{Horas} * \text{Temperatura}^2$$

Anexo 6-9

ANAVA RI EN LOS AZÚCARES EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura °C

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Hojas"; Metabolito = "Azúcares"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.00079456	3	0.000264853	29.84	0.0000
Residuo	0.000443753	50	0.00000887507		
Total (Corr.)	0.00123831	53			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	0.0000208718	1	0.0000208718	2.35	0.1314
Horas	0.000116995	1	0.000116995	13.18	0.0007
Temperatura*Horas	0.00000536484	1	0.00000536484	0.60	0.4405
Residuo	0.000443753	50	0.00000887507		
Total (corregido)	0.00123831	53			

R-Cuadrada = 64.1647 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 62.0146 por ciento

Error estándar del est. = 0.00297911

Error medio absoluto = 0.00218435

Estadístico Durbin-Watson = 2.30515 (P=0.7917)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
CONSTANTE	0.03098	0.00206468	0.026833	0.0351271
Temperatura °C	-0.000120392	0.0000785063	-0.000278077	0.0000372925
Horas	-0.000241944	0.0000666373	-0.000375789	-0.000108099
Temperatura °C*Horas	0.00000196998	0.00000253378	-0.00000311928	0.00000705924

La ecuación del modelo ajustado es:

Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ Azúcares totales = **0.03098 - 0.000120392*Temperatura - 0.000241944*Horas + 0.00000196998*Temperatura *Horas**

Anexo 6-10

ANAVA *RI* EN LOS LÍPIDOS EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Hojas"; Metabolito = "Lípidos"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.0000114373	5	0.00000228746	1.19	0.3272
Residuo	0.0000861792	45	0.00000191509		
Total (Corr.)	0.0000976165	50			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	9.81772E-8	1	9.81772E-8	0.05	0.8219
Horas	0.00000228584	1	0.00000228584	1.19	0.2804
Horas*Horas	2.04355E-7	1	2.04355E-7	0.11	0.7454
Temperatura*Temperatura	2.65806E-7	1	2.65806E-7	0.14	0.7112
Temperatura*Horas	0.00000585505	1	0.00000585505	3.06	0.0872
Residuo	0.0000861792	45	0.00000191509		
Total (corregido)	0.0000976165	50			

R-Cuadrada = 11.7166 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 1.9073 por ciento

Error estándar del est. = 0.00138387

Error medio absoluto = 0.00106936

Estadístico Durbin-Watson = 1.84076 (P=0.1282)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0171985	0.00245793	0.012248	0.0221491
Temperatura °C	0.0000466029	0.000205827	-0.000367955	0.00046116
Horas	-0.0000511936	0.0000468585	-0.000145572	0.0000431844
Horas^2	2.334E-7	7.14504E-7	-0.00000120569	0.00000167249
Temperatura °C^2	-0.00000151189	0.00000405819	-0.00000968552	0.00000666174
Temperatura °C*Horas	0.00000215548	0.00000123275	-3.27405E-7	0.00000463837

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Lípidos} = 0.0171985 + 0.0000466029 * \text{Temperatura} - 0.0000511936 * \text{Horas} + 2.334\text{E-}7 * \text{Horas}^2 - 0.00000151189 * \text{Temperatura}^2 + 0.00000215548 * \text{Temperatura} * \text{Horas}$$

Anexo 6-11

ANAVA RI EN LAS PROTEÍNAS EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Hojas"; Metabolito = "Proteínas"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	7.41178E-7	5	1.48236E-7	2.04	0.0907
Residuo	0.00000342169	47	7.2802E-8		
Total (Corr.)	0.00000416287	52			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	1.04884E-7	1	1.04884E-7	1.44	0.2360
Horas	1.88185E-7	1	1.88185E-7	2.58	0.1146
Horas*Horas	3.11977E-7	1	3.11977E-7	4.29	0.0440
Temperatura*Temperatura	6.14873E-8	1	6.14873E-8	0.84	0.3628
Temperatura*Horas	7.6878E-9	1	7.6878E-9	0.11	0.7467
Residuo	0.00000342169	47	7.2802E-8		
Total (corregido)	0.00000416287	52			

R-Cuadrada = 17.8045 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 9.06028 por ciento

Error estándar del est. = 0.000269818

Error medio absoluto = 0.00019565

Estadístico Durbin-Watson = 2.59183 (P=0.9501)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0117341	0.000474717	0.0107791	0.0126891
Temperatura	0.0000476675	0.0000397136	-0.0000322261	0.000127561
Horas	0.000014405	0.00000895969	-0.00000361957	0.0000324296
Horas ²	-2.85585E-7	1.37958E-7	-5.6312E-7	-8.04944E-9
Temperatura ²	-7.1946E-7	7.82863E-7	-0.00000229438	8.5546E-7
Temperatura*Horas	-7.45734E-8	2.29485E-7	-5.36239E-7	3.87092E-7

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Proteínas} = 0.0117341 + 0.0000476675 * \text{Temperatura} + 0.000014405 * \text{Horas} - 2.85585\text{E-}7 * \text{Horas}^2 - 7.1946\text{E-}7 * \text{Temperatura}^2 - 7.45734\text{E-}8 * \text{Temperatura} * \text{Horas}$$

Anexo 6-12

ANAVA RI EN LA CELULOSA EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Hojas"; Metabolito = "Celulosa"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.00000788513	4	0.00000197128	4.95	0.0021
Residuo	0.0000179033	45	3.97852E-7		
Total (Corr.)	0.0000257885	49			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura °C	7.22703E-8	1	7.22703E-8	0.18	0.6720
Horas	0.00000350923	1	0.00000350923	8.82	0.0048
Temperatura °C*Temperatura °C	4.89412E-8	1	4.89412E-8	0.12	0.7274
Horas*Horas	0.00000149622	1	0.00000149622	3.76	0.0588
Residuo	0.0000179033	45	3.97852E-7		
Total (corregido)	0.0000257885	49			

R-Cuadrada = 30.5762 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 24.4052 por ciento

Error estándar del est. = 0.000630755

Error medio absoluto = 0.000459723

Estadístico Durbin-Watson = 1.7194 (P=0.0727)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0122505	0.00111928	0.0099962	0.0145049
Temperatura	0.0000407379	0.0000955828	-0.000151776	0.000233252
Horas	0.0000483247	0.0000162714	0.0000155524	0.0000810969
Temperatura ²	-6.6191E-7	0.00000188722	-0.00000446297	0.00000313915
Horas ²	-6.34213E-7	3.27038E-7	-0.0000012929	2.44769E-8

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Celulosa} = 0.0122505 + 0.0000407379 * \text{Temperatura} + 0.0000483247 * \text{Horas} - 6.6191\text{E-}7 * \text{Temperatura}^2 - 6.34213\text{E-}7 * \text{Horas}^2$$

Anexo 6-13

ANAVA *RI* EN EL MATERIAL ORGÁNICO EN TALLO DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Tallo"; Metabolito = "Material Orgánico"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.0000400892	3	0.0000133631	20.71	0.0000
Residuo	0.0000322673	50	6.45346E-7		
Total (Corr.)	0.0000723565	53			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	0.0000038581	1	0.0000038581	5.98	0.0180
Horas	0.0000146332	1	0.0000146332	22.68	0.0000
Horas*Horas	0.00000569454	1	0.00000569454	8.82	0.0046
Residuo	0.0000322673	50	6.45346E-7		
Total (corregido)	0.0000723565	53			

R-Cuadrada = 55.4051 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 52.7294 por ciento

Error estándar del est. = 0.000803334

Error medio absoluto = 0.000588093

Estadístico Durbin-Watson = 1.81327 (P=0.1627)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0129865	0.000384567	0.0122141	0.0137589
Temperatura	0.0000327367	0.0000133889	0.00000584427	0.0000596292
Horas	0.000095781	0.0000201143	0.0000553801	0.000136182
Horas ²	-0.00000119596	4.02609E-7	-0.00000200462	-3.87294E-7

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 = 0.0129865 + 0.0000327367 * \text{Temperatura} + 0.000095781 * \text{Horas} - 0.00000119596 * \text{Horas}^2$$

Anexo 6-14

ANAVA ALMIDÓN EN TALLO DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Tallo"; Metabolito = "Almidón"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.0000239853	3	0.0000079951	4.56	0.0069
Residuo	0.0000823875	47	0.00000175292		
Total (Corr.)	0.000106373	50			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	0.00000988263	1	0.00000988263	5.64	0.0217
Temperatura*Horas	0.000014636	1	0.000014636	8.35	0.0058
Horas*Horas	0.00000519103	1	0.00000519103	2.96	0.0919
Residuo	0.0000823875	47	0.00000175292		
Total (corregido)	0.000106373	50			

R-Cuadrada = 22.5483 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 17.6046 por ciento

Error estándar del est. = 0.00132398

Error medio absoluto = 0.000932725

Estadístico Durbin-Watson = 2.33564 (P=0.8164)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0180638	0.000742057	0.016571	0.0195567
Temperatura	-0.000075156	0.0000316526	-0.000138833	-0.0000114791
Temperatura*Horas	0.00000260416	9.01235E-7	7.91109E-7	0.00000441722
Horas ²	-7.97682E-7	4.63537E-7	-0.0000017302	1.34837E-7

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 = 0.0180638 - 0.000075156 * \text{Temperatura} + 0.00000260416 * \text{Temperatura} * \text{Horas} - 7.97682\text{E-}7 * \text{Horas}^2$$

Anexo 6-15

ANAVA RI EN LOS AZÚCARES EN TALLO DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Tallo"; Metabolito = "Azúcares"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.000206606	4	0.0000516515	4.31	0.0048
Residuo	0.000551889	46	0.0000119976		
Total (Corr.)	0.000758495	50			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	0.00000806291	1	0.00000806291	0.67	0.4166
Horas	0.0000798345	1	0.0000798345	6.65	0.0132
Temperatura*Horas	0.00000382847	1	0.00000382847	0.32	0.5749
Horas*Horas	0.000159808	1	0.000159808	13.32	0.0007
Residuo	0.000551889	46	0.0000119976		
Total (corregido)	0.000758495	50			

R-Cuadrada = 27.2389 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 20.9119 por ciento

Error estándar del est. = 0.00346375

Error medio absoluto = 0.00255623

Estadístico Durbin-Watson = 1.96822 (P=0.3049)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0279549	0.00258629	0.022749	0.0331608
Temperatura	-0.0000783652	0.0000955926	-0.000270784	0.000114053
Horas	0.000310688	0.000120441	0.0000682513	0.000553124
Temperatura*Horas	0.00000174283	0.00000308524	-0.00000446745	0.0000079531
Horas ²	-0.00000652899	0.00000178893	-0.0000101299	-0.00000292805

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 = 0.0279549 - 0.0000783652 * \text{Temperatura} + 0.000310688 * \text{Horas} + 0.00000174283 * \text{Temperatura} * \text{Horas} - 0.00000652899 * \text{Horas}^2$$

Anexo 6-16

ANAVA *RI* EN EL MATERIAL ORGÁNICO EN RAÍZ DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Raíces"; Metabolito = "Material Orgánico"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.0000523636	4	0.0000130909	23.13	0.0000
Residuo	0.0000277344	49	5.66008E-7		
Total (Corr.)	0.000080098	53			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	3.26825E-7	1	3.26825E-7	0.58	0.4510
Temperatura*Horas	5.88369E-8	1	5.88369E-8	0.10	0.7485
Horas	0.0000199448	1	0.0000199448	35.24	0.0000
Horas*Horas	0.000017569	1	0.000017569	31.04	0.0000
Residuo	0.0000277344	49	5.66008E-7		
Total (corregido)	0.000080098	53			

R-Cuadrada = 65.3744 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 62.5478 por ciento

Error estándar del est. = 0.000752335

Error medio absoluto = 0.00050583

Estadístico Durbin-Watson = 1.553 (P=0.0195)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0121647	0.000526411	0.0111068	0.0132225
Temperatura	0.0000150653	0.0000198258	-0.0000247762	0.0000549067
Temperatura*Horas	-2.06304E-7	6.39874E-7	-0.00000149218	0.00000107957
Horas	0.000146701	0.0000247133	0.0000970379	0.000196365
Horas ²	-0.00000210068	3.77049E-7	-0.00000285839	-0.00000134297

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 = 0.0121647 + 0.0000150653 \cdot \text{Temperatura} - 2.06304\text{E-}7 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Horas} + 0.000146701 \cdot \text{Horas} - 0.00000210068 \cdot \text{Horas}^2$$

Anexo 6-17

ANAVA RI EN EL ALMIDÓN EN RAÍZ DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Raíces"; Metabolito = "Almidón"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.0000450254	5	0.00000900508	8.03	0.0000
Residuo	0.0000515589	46	0.00000112085		
Total (Corr.)	0.0000965843	51			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	0.00000856563	1	0.00000856563	7.64	0.0082
Horas	0.0000274272	1	0.0000274272	24.47	0.0000
Temperatura*Horas	0.00000344692	1	0.00000344692	3.08	0.0862
Temperatura*Temperatura	0.00000808558	1	0.00000808558	7.21	0.0100
Horas*Horas	0.0000196006	1	0.0000196006	17.49	0.0001
Residuo	0.0000515589	46	0.00000112085		
Total (corregido)	0.0000965843	51			

R-Cuadrada = 46.6177 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 40.8153 por ciento

Error estándar del est. = 0.0010587

Error medio absoluto = 0.000831554

Estadístico Durbin-Watson = 2.27384 (P=0.6661)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0130603	0.00190653	0.00922268	0.016898
Temperatura	0.000440414	0.000159314	0.000119731	0.000761096
Horas	0.000175914	0.0000355618	0.000104332	0.000247497
Temperatura*Horas	-0.00000157906	9.00443E-7	-0.00000339156	2.33441E-7
Temperatura ²	-0.00000840898	0.00000313084	-0.000014711	-0.00000210692
Horas ²	-0.00000231131	5.52708E-7	-0.00000342385	-0.00000119876

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 = 0.0130603 + 0.000440414 * \text{Temperatura} + 0.000175914 * \text{Horas} - 0.00000157906 * \text{Temperatura} * \text{Horas} - 0.00000840898 * \text{Temperatura}^2 - 0.00000231131 * \text{Horas}^2$$

Anexo 6-18

ANAVA RI EN LOS AZÚCARES EN RAÍZ DE PLANTAS MARCADAS

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 0

Número de Factores Cuantitativos: 2

A=Temperatura (°C)

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Órgano = "Raíces"; Metabolito = "Azúcares"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.000581707	3	0.000193902	15.85	0.0000
Residuo	0.00057501	47	0.0000122343		
Total (Corr.)	0.00115672	50			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperatura	0.0000189069	1	0.0000189069	1.55	0.2200
Horas	0.000493939	1	0.000493939	40.37	0.0000
Horas*Horas	0.000362391	1	0.000362391	29.62	0.0000
Residuo	0.00057501	47	0.0000122343		
Total (corregido)	0.00115672	50			

R-Cuadrada = 50.2895 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 47.1165 por ciento

Error estándar del est. = 0.00349775

Error medio absoluto = 0.00246192

Estadístico Durbin-Watson = 1.86486 (P=0.2179)

Límites de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados (Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)

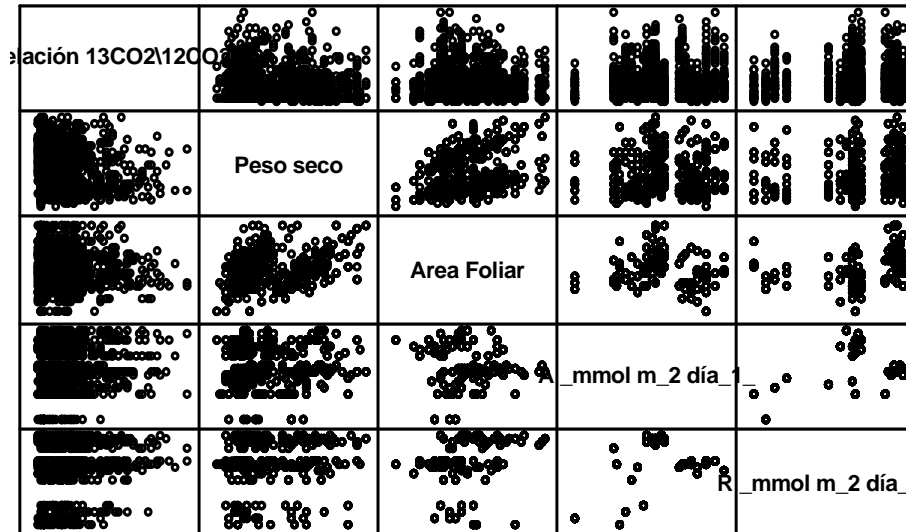
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Constante	0.0215709	0.00169454	0.0181619	0.0249799
Temperatura	-0.0000747005	0.00006009	-0.000195586	0.0000461851
Horas	0.000572627	0.0000901206	0.000391328	0.000753927
Horas^2	-0.00000981862	0.00000180406	-0.0000134479	-0.00000618932

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 = 0.0215709 - 0.0000747005 * \text{Temperatura} + 0.000572627 * \text{Horas} - 0.00000981862 * \text{Horas}^2$$

Anexo 6-19

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DOS A DOS ENTRE: RELACIÓN $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$, PESO SECO, ÁREA FOLIAR, FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACIÓN



Resumen Estadístico

	Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$	Peso seco	Área Foliar	A $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$	R $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$
Recuento	1112	1112	1112	1112	1112
Promedio	0.0169475	2.53403	0.0549824	41828.2	-76455.4
Desviación Estándar	0.00494641	1.39702	0.0121437	28321.8	49038.4
Coefficiente de Variación	29.1866%	55.1304%	22.0864%	67.7099%	-64.1399%
Mínimo	0.0116333	0.0656	0.02443	-33222.8	-207005.
Máximo	0.0405646	5.938	0.08746	93326.7	-24738.0
Rango	0.0289313	5.8724	0.06303	126550.	182267.
Sesgo Estandarizado	21.1499	5.04076	5.50973	-4.13634	-15.7584
Curtosis Estandarizada	18.7569	-6.20828	0.634843	-0.773992	5.07111

Correlaciones

	Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$	Peso seco	Área Foliar	A $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$	R $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$
Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$		-0.1761 (1112) 0.0000	-0.0336 (1112) 0.2632	0.0260 (1112) 0.3859	0.0188 (1112) 0.5301
Peso seco	-0.1761 (1112) 0.0000		0.3487 (1112) 0.0000	0.0544 (1112) 0.0693	0.0977 (1112) 0.0011
Área Foliar	-0.0336 (1112) 0.2632	0.3487 (1112) 0.0000		-0.1060 (1112) 0.0004	0.3159 (1112) 0.0000
A $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$	0.0260 (1112) 0.3859	0.0544 (1112) 0.0693	-0.1060 (1112) 0.0004		0.2834 (1112) 0.0000
R $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$	0.0188 (1112) 0.5301	0.0977 (1112) 0.0011	0.3159 (1112) 0.0000	0.2834 (1112) 0.0000	

Valor Superior = Correlación; Valor del Medio = Tamaño de Muestra; Valor Inferior = Valor P

La tabla anterior muestra las correlaciones momento producto de Pearson, entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95.0%.

Los siguientes pares de variables tienen valores $P < 0.05$:

Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ y Peso Seco (g)

Peso Seco (g) y Área Foliar (m^2)

Peso Seco (g) y Respiración [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]

Área Foliar (m^2) y Fotosíntesis [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]

Área Foliar (m^2) y Respiración [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]

Fotosíntesis [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] y Respiración [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]

7. Experimento 3

7.1 Objetivo específico

Determinar la dinámica de la movilización de los asimilados en la etapa reproductiva del cafeto *Coffea arabica* L.

7.2 Revisión de literatura

La producción de biomasa de un cultivo está altamente relacionada con el tamaño y la actividad de órganos fuente y demanda, y de acuerdo con su estado fenológico y fisiológico, se genera un balance que influencia los procesos de F y R (Matsuda *et al.*, 2011). Al respecto, González-Real *et al.* (2008, 2009) concluyeron que el concepto de fuente y demanda es fundamental cuando se estudia en especies con ciclos de cosecha sucesivos, lo que genera períodos alternos de altas y bajas producciones, así como el crecimiento vegetativo simultáneo con los procesos de floración y fructificación.

Bajo sombra las condiciones microambientales pueden afectar la fuerza del vertedero por menor transpiración asociadas con menor DPV . En *P. persica* L. no es claro si la menor tasa de crecimiento del fruto es atribuible a un efecto sobre el órgano fuente (reducción de F) o pudo ser debido a un efecto directo sobre los frutos demanda, de tal forma que las condiciones ambientales modifican el balance de agua en el fruto y disminuye su fuerza de atracción (Morandi *et al.*, 2010, 2011).

En pepino (*Cucumis sativus* L.) en un ciclo día-noche normal de $T^{\circ}C$, el fruto crece más rápido en la noche, mientras que la tasa de exportación de asimilados hacia ellos es más alta en el día (Miao *et al.*, 2009). Park (2011) sugirió que una mayor carga de frutos de caqui (*Diospyros kaki* L.) afectó la distribución de asimilados hacia las raíces y otros órganos vertederos permanentes, lo que demostró la importancia que representan los frutos en el balance Fuente-Demanda de la planta total.

Beriashvili y Beriashvili (1996) en frutos de uva (*Vitis vinifera* L.) describieron dos rutas de F en las cuales en estados tempranos de desarrollo el CO_2 se asimila como malato (fotosíntesis C_4) que involucra $PEPC$, y al inicio de la maduración la F es C_3 . Así, la disminución en la actividad de $PEPC$ en la etapa de maduración soporta la teoría de un “suiche” fotosintético en frutos de muchas especies (Blanke y Lenz, 1989). De igual manera el cociente de R de numerosas variedades de uva incrementa desde 1, previo a la maduración, a más de 1.5 en post-maduración, lo que puede ser debido al uso de malato como fuente de energía para éste proceso, la cual libera más CO_2 por

molécula de O₂ consumido que los azúcares o el almidón, que son usados en mayor medida en la maduración de frutos climatéricos (Sweetman *et al.*, 2009).

En los cultivares Atago y Shinkou de pera (*Pyrus communis* L.) Zhang y Tanabe (2008) encontraron que todos los órganos de las ramas exportaron ¹³C hacia los frutos en desarrollo y brotes nuevos. Los órganos vegetativos, al finalizar su crecimiento, son fuente importante de metabolitos para los frutos durante el período de rápido crecimiento y maduración, que hace del proceso Fuente-Demanda un sistema equilibrado por: tipo de rama vegetativa que exporta carbono, la posición del fruto, y la distancia entre fuente y demanda. Concluyeron que la cv. Atago presentó mayor fuerza de demanda. Igualmente, en Shinkou, la velocidad de crecimiento y desarrollo de las ramas vegetativas afectó la traslocación de asimilados hacia los frutos.

En *L. esculentum* Mill., Edwards *et al.* (2010) encontraron que el almidón se acumula en las hojas cuando se producen más asimilados que los que pueden exportar hacia los frutos, lo cual también puede ser efecto de una baja fuerza de la demanda. Así, cuando crecen en invernadero se conocen como “sink-limited” debido al raleo que se hace para asegurar el crecimiento uniforme de los frutos restantes. Concluyeron que las hojas de las posiciones 7 a 9 son las que presentan un mejor balance de carbono en la planta, y están lo suficientemente bien posicionadas en el dosel para acumular almidón y traslocar los asimilados a los frutos adyacentes, los cuales están en pleno desarrollo.

Para el cultivo del café, Franck *et al.* (2006) consideraron que para el crecimiento de los frutos se necesitan los carbohidratos producidos por las hojas de las ramas productivas y también por su propia *F*; así mismo otras fuentes de carbohidratos son las ramas no productivas y las reservas del tallo. Igualmente reportaron que la sacarosa es esencial para el control de las relaciones Fuente-Demanda (Franck *et al.*, 2006), y es uno de los principales componentes de los frutos (Geromel *et al.*, 2008).

En Colombia se midieron los cambios en morfología, anatomía, ultra-estructura, intercambio de CO₂, actividad de *Rubisco* y *PEPC*, y pesos fresco y seco de frutos de *Coffea arabica* L. cv. Colombia, en intervalos quincenales, entre floración y maduración, encontrando: el epicarpio presentó una capa de células con estomas protuberantes, mientras el mesocarpio varias capas de células parenquimáticas de diferentes tamaños y formas; ambos tejidos presentaron cloroplastos con grana, clorofila y gránulos de almidón que confirmó su actividad fotosintética. La *Rubisco* fue menor y la *PEPC* mayor que en las hojas, lo que sugiere que *PEPC* es el mecanismo de carboxilación predominante en frutos (López *et al.*, 2000), tal como sucede en muchas especies. La actividad demanda fue alta en estados tempranos de desarrollo y disminuyó con la edad y ajustaron una curva sigmoide de crecimiento que permitió identificar tres períodos: una etapa logarítmica desde la floración hasta los 60 días, una exponencial hasta los 180 días y una de estabilización hasta madurez a los 240 días (Salazar, 1993; Salazar *et al.*, 1994a, b; Mosquera *et al.*, 1997).

Mosquera *et al.* (1997) determinaron el intercambio gaseoso en los frutos de los materiales Colombia, Caturra, Híbrido de Timor, Típica y Borbón y *C. canephora*, expuestos a luz y oscuridad. En todos la actividad fotosintética fue mayor en los primeros estados de desarrollo y disminuyó a medida que el fruto se acercó a la maduración (26 a 28 semanas de edad). Las mayores tasas de *F* las presentaron la variedad Borbón, el Híbrido de Timor y la especie *C. canephora*.

Por su parte Ocampo (2003) cuantificó quincenalmente la F y el crecimiento de frutos de plantas de *C. arabica* L. var. Colombia. La acumulación de materia seca presentó cuatro etapas: crecimiento lento, crecimiento rápido, fase de estabilización y fase de disminución asociada a procesos degradativos y de postmaduración; además, el máximo crecimiento se dio 224 días después de la floración (32 semanas). La F de los frutos se interpretó como una acumulación de CO_2 en los espacios libres internos, obtenido de la atmósfera y de la R , tanto de hojas como de los mismos frutos, aunque Buchanan *et al.* (2000) discuten que la principal función de los cloroplastos en frutos es la biosíntesis de metabolitos por el CO_2 respiratorio reciclado, más que una función fotosintética.

En otro estudio, con el fin de observar el cambio en la relación Fuente-Demanda de plantas completas de *C. arabica* L. var. Colombia de 2 años de edad, Gómez (2004) retiró porcentajes diferenciales de frutos en sus estados iniciales de desarrollo. Encontró que las tasas de F foliar no fueron diferentes al control, posterior a la aplicación de los tratamientos. Mayores tasas de R se observaron cuando se retiraron el 50 y 75% de los frutos. Concluyó que al retirar manualmente frutos en pleno crecimiento y desarrollo disminuye la fuerza de este vertedero, permitiendo que los carbohidratos fabricados se distribuyan en los frutos restantes, o en otros órganos convertidos ahora en fuertes demandantes, resultados similares a los reportados por Cannell (1971a, b), Angrand (2002) y Cunha (2007), quienes además sugirieron que los frutos verdes del café se autoabastecen en un 20-30% de los asimilados en plantas en total actividad reproductiva, contribuyendo al balance Fuente-Demanda total de la planta.

Reis *et al.*, (2007), en el cultivar Catuaí Vermelho IAC 44, evaluaron entre Enero y Junio de 2006 la movilización de proteínas solubles, nitrógeno, clorofilas y almidón en las hojas durante el desarrollo de los frutos en campo. Encontraron que tales compuestos, excepto el almidón, aumentaron linealmente con el nitrógeno aplicado. En enero, cuando los frutos iniciaron su desarrollo, las hojas tuvieron un alto contenido de tales compuestos. Durante el crecimiento del fruto los asimilados sintetizados en las hojas disminuyeron progresivamente, lo cual coincidió con procesos de senescencia foliar, promoviendo la removilización en particular hacia el endospermo y llenado de la semilla, la cual es altamente exigente en carbohidratos y minerales.

Finalmente, en plantas de *C. arabica* L. var. Catuaí IAC-44, cultivadas a 720 y 950 m.s.n.m., Laviola *et al.*, (2007) encontraron que en los frutos a menor altitud hubo mayor acumulación de almidón y azúcares solubles totales, así como azúcares reductores y no reductores. El almidón fue mayor cuando los frutos se encontraban en estado de rápida expansión, coincidiendo con una rápida caída en la concentración de carbohidratos en las hojas del tercer y cuarto nudo, indicando que es el período más crítico para la concentración de carbohidratos en las hojas.

7.3 Materiales y métodos

Se determinó la Relación Isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el tiempo de los principales compuestos del metabolismo fotosintético [material orgánico (MO), almidón, azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa), lípidos, proteínas y celulosa], en órganos fuente (hojas) y

demanda (frutos en 3 estados de desarrollo), así como el intercambio gaseoso (F y R) en plantas de *Coffea arabica* L.

7.3.1 Ubicación

El experimento se llevó a cabo en la estación central Naranjal de Cenicafé, localizada a los 04°58'N latitud, 75°39'W longitud y 1381 m.s.n.m de altitud (Cordillera Central - Vertiente Occidental), en el municipio de Chinchiná, Caldas, Colombia, con temperatura mínima promedio anual de 16.6°C, temperatura máxima promedio anual de 26.8°C, temperatura media promedio anual de 20.9°C, precipitación acumulada anual de 2782 mm y humedad relativa promedio anual de 78% (Fedecafé, 2012). El área pertenece, de acuerdo con la clasificación de Holdridge, a Bosque muy Húmedo Premontano (bmh-P) (Holdridge, 1987).

7.3.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Coffea arabica* L. variedad Castillo® progenies BH1409 y CU1970 de tres años de edad, sembradas en suelo unidad Chinchiná (*Typic Dystrandepts*), a plena exposición solar, y cuyos tercio medio y superior presentaron ramas con hojas y frutos en tres estados de desarrollo, adecuados para el experimento propuesto. Las plantas provenían de un manejo agronómico de acuerdo con las recomendaciones de Cenicafé.

Según Salazar *et al.* (1994a, b) los frutos de café se clasifican en cuatro estados de desarrollo, donde los tres primeros fueron elegidos para la evaluación del experimento, con las siguientes características: estado 1 que va desde floración hasta la octava semana, caracterizado por un crecimiento lento, con apariencia externa de color verde y semejanza a la cabeza de un fósforo; estado 2 que va desde las semanas nueve a la diecisiete, de rápido crecimiento tanto en dimensiones como en peso fresco, con un interior muy acuoso (85%); y estado 3 entre las semanas diecisiete y veinticuatro, donde empieza a perder agua y ocurre el endurecimiento del endosperma o formación de la semilla propiamente dicha.

7.3.3 Metodología de marcación de las plantas con $^{13}\text{CO}_2$

7.3.3.1 Mezcla de gases

El gas de marcación con concentración de $^{13}\text{CO}_2$ conocida y las consideraciones para su preparación fueron las mismas utilizadas en los experimentos 1 y 2.

7.3.4 Desarrollo del experimento

El experimento se desarrolló en campo, bajo las condiciones climáticas de $T^\circ\text{C}$, HR (%) y RFA [$\mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] del momento. A 18 ramas de cada genotipo, escogidas por su homogeneidad en hojas y frutos, se les midió el área foliar con la metodología

de Arcila (1987). Las ramas se introdujeron en bolsas plásticas (30 L de volumen) sostenidas por una estructura cilíndrica, fabricada en alambre calibre 2, para su sujeción a la rama, y fue soportada con nylon al tallo de la planta, que permitió que la rama, hojas y frutos quedaran libres al interior de la bolsa. Previamente, las ramas elegidas se anillaron en su base, con el fin de evitar el movimiento de asimilados vía floema fuera de ella. Al inicio del experimento se adicionó aire normal de manera continua durante dos horas. Luego, a 9 de las 18 ramas por genotipo (en adelante marcadas), se les inyectó gas del cilindro preparado con $^{13}\text{CO}_2$ por espacio de 1 minuto y 45 segundos, incrementando la concentración dentro de la bolsa a 700-800 ppm, en 3 momentos, con espaciamiento de 1,5 horas. Posteriormente, a las 1,5 horas de la última marcación, a las 48 y 72 horas, se extrajeron 3 ramas, se separaron sus órganos constitutivos (rama, hojas y frutos en estados 1, 2 y 3) y se llevaron a nitrógeno líquido y luego a freezer a -70°C hasta su liofilización. Al otro grupo de 18 ramas (9 por genotipo), en los mismos momentos se les inyectó con jeringa 15 ml de CO_2 puro, incrementando la concentración de CO_2 de manera similar, y se procedió de igual forma como se describió con anterioridad, siendo estas las ramas control sin marcación.

7.3.4.1 Medición del intercambio gaseoso (IG)

Se midió el intercambio gaseoso (F y R) en hojas de los nudos 1 al 5 (desde el ápice de la rama hacia el tallo) entre las 5:00 a.m y las 10:00 p.m durante tres días continuos, incluyendo el día de la marcación con $^{13}\text{CO}_2$. Se utilizó un equipo portátil de sistema abierto ADC-LCi (Analytical Development Co. Ltd. Hoddesdon, Hertz, England), que consta de un analizador infrarrojo de gases (IRGA) para CO_2 y H_2O y una cámara de hojas ADC-PLC-4 de 6.25 cm^2 de área de medición. El IRGA de CO_2 se calibró con aire de 503 ppm de CO_2 y el IRGA de H_2O se calibró a presión de vapor de agua de 1.15 KPa, empleando un generador de vapor de agua ADC-WG-601.

En la figura 7-1 se muestran secuencialmente las actividades realizadas.

7.3.4.2 Total de material vegetal evaluado

Se tuvieron dos genotipos: *BH1409* y *CU1970*, y dos tratamientos: marcadas y control. Luego de la marcación se llevó a cabo el muestreo destructivo del material vegetal a las 0, 48 y 72 horas (se consideró tiempo 0 aproximadamente 1,5 horas posterior a la marcación) a 3 ramas por tratamiento (repeticiones), para un total de 36 ramas totales evaluadas (2 genotipos * 2 tratamientos * 3 horas evaluadas * 3 repeticiones) al final del experimento.

Figura 7-1: Imágenes que ilustran el desarrollo del experimento 3: anillamiento en la base de la rama para evitar el movimiento de asimilados fuera de ella (**A**); calibración del medidor de flujo para el paso del aire proveniente del cilindro de $^{13}\text{CO}_2$ (**B**); disposición de la bolsa en la rama (**C**); ingreso del aire proveniente del cilindro de $^{13}\text{CO}_2$ (**D**); aplicación de CO_2 puro con jeringa a la bolsa con las ramas control (**E**); bolsa y rama enriquecidas con $^{13}\text{CO}_2$ o CO_2 puro (se observa la bolsa totalmente inflada) (**F**); recolección del material vegetal (rama, hojas y frutos tipo 1, 2 y 3, para posterior almacenamiento en nitrógeno líquido) (**G**); medición del *IG* (fotosíntesis y respiración - día y noche) en hojas individuales de los nudos 1 al 5 (**H**).



7.3.4.3 Liofilización de las muestras

Las muestras se liofilizaron y molieron siguiendo los mismos lineamientos del experimento dos.

7.3.4.3.1 Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) y cuantificación de los metabolitos

La RI y la cuantificación de los metabolitos, en ramas, hojas y frutos tipo 1, 2 y 3, se hicieron bajo la misma metodología utilizada en el experimento dos.

7.3.5 Análisis de la información

Se llevó a cabo el análisis descriptivo de las variables climáticas $T^\circ\text{C}$ y RFA , así como de la RI en el tiempo. Se realizaron análisis de varianza de una vía y modelos espaciales, para cada órgano y metabolito, que describieron la respuesta de RI a la F y la R con el tiempo. Se cuantificó cada uno de los metabolitos en cada órgano y tiempo. Las integraciones del área bajo la curva para obtener el total diario de F y R [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] se realizaron con la subrutina *AREA.XFM* del programa *Scientific Data Analysis and Graphing Software (SigmaPlot® 10.0)*. Se realizó prueba de comparación de medias por Duncan y Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, cuando así lo indicó el análisis, utilizando el programa *Statistical Analysis System (SAS)* versión 8.0.

7.4 Resultados

7.4.1 Comportamiento de la Temperatura ($T^\circ\text{C}$), Fotosíntesis (F) - Respiración (R) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] y Radiación Fotosintéticamente Activa [$RFA - \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$]

La oferta ambiental bajo condiciones de campo presentó valores de $T^\circ\text{C}$ entre 20°C y 35°C y hasta $1600 \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de RFA , considerados adecuados para que el comportamiento de F y R [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] fuera normal. Las anteriores consideraciones se presentaron para ambos genotipos lo que permite asegurar condiciones homogéneas (figuras 7-2A y 7-2B).

Los valores de F y R promedio diario [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] se obtuvieron al integrar las áreas bajo la curva de las hojas individuales de los nudos 1 al 5 (figura 7-3). Mayores tasas de F y R presentó el material *CU1970*, lo que es confirmado en la figura 7-4A y 7-4B, donde hubo diferencias estadísticas entre los dos materiales (anexo 7-1). El balance de F_n fue mayor para el genotipo *CU1970* [$99798 \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$], mientras que para el genotipo *BH1409* fue menor [$87920 \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$], que coincide con lo encontrado en el experimento dos con respecto a los genotipos evaluados, los cuales tienen la misma genealogía, pues comparten los padres, lo que los hace muy cercanos genéticamente y únicamente difieren en su nomenclatura ($CX2178=CU1970$ y $BH1247=BH1409$). No hubo diferencias entre plantas marcadas y control para F y R , lo que sugirió que la marcación no afectó el material vegetal por efecto del ${}^{13}\text{CO}_2$ diferencial (anexo 7-1).

Figura 7-2: Fotosíntesis (F) - Respiración (R) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] y Temperatura ($T^\circ\text{C}$) (**A**). Radiación Fotosintéticamente Activa [$RFA - \mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] (**B**), en plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo®, genotipos BH1409 y CU1970, marcadas y control, durante tres días continuos de medición en el campo.

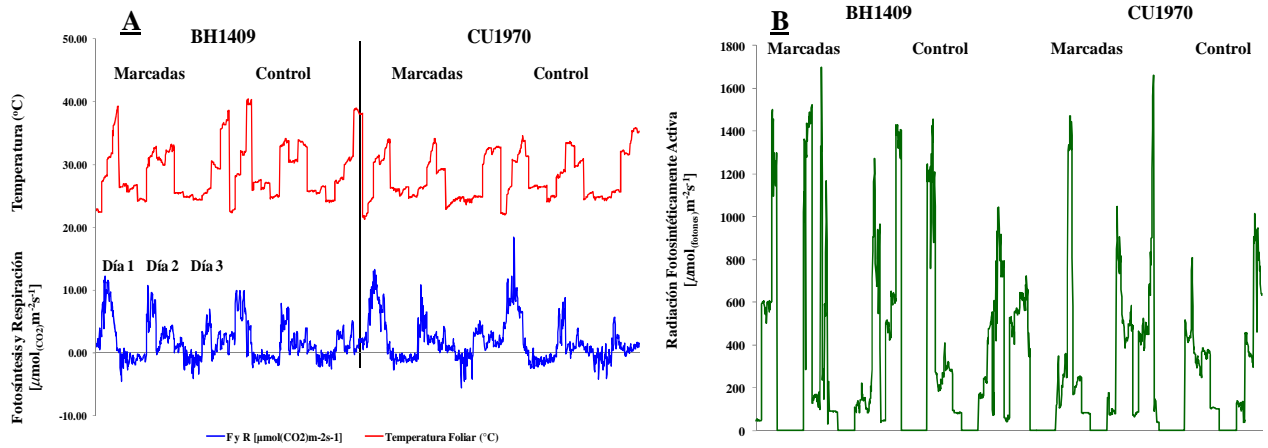


Figura 7-3: Integración promedio diaria de Fotosíntesis (F) y Respiración (R) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] bajo condiciones de campo, en las hojas de los nudos 1 al 5, en *Coffea arabica* L. cv. Castillo®, plantas marcadas y control, genotipos BH1409 y CU1970. $n=3$ días completos de medición.

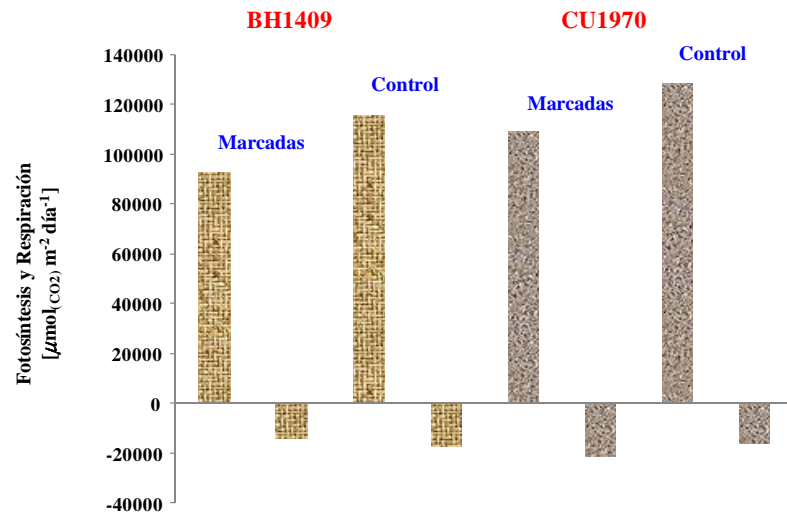
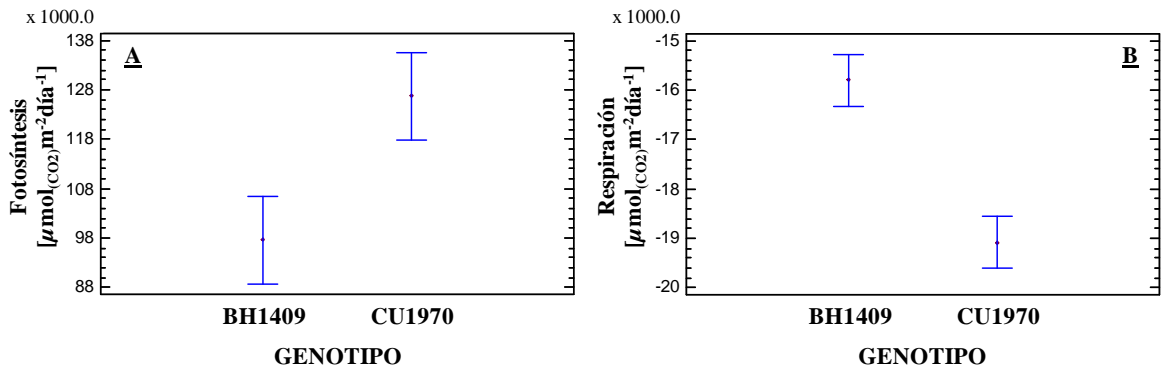
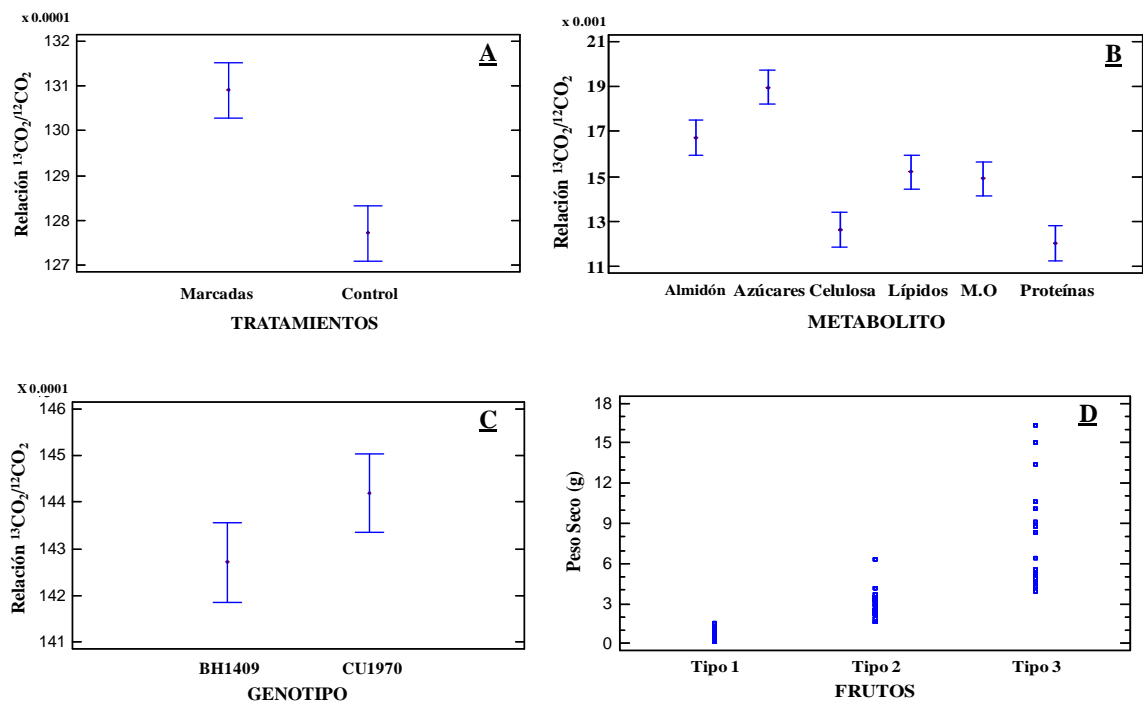


Figura 7-4: Diferencias en Fotosíntesis (*F*) (**A**) y Respiración (*R*) (**B**) [$\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] entre los genotipos de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® BH1409 y CU1970.



Similar al experimento dos, y con el fin de valorar si la metodología de marcación con $^{13}\text{CO}_2$ fue adecuada para condiciones de campo, se hizo una anava y prueba de medias por diferencia mínima significativa (95%) donde se involucraron todas las variables (anexo 7-2). Se evaluó el efecto de los factores cualitativos tratamiento, metabolito y genotipo, y los factores cuantitativos *F*, *R* y peso seco, sobre la *RI*. El modelo de respuesta fue altamente significativo ($P < 0.0001$) con un coeficiente de determinación de 49.82%. Además se encontró que hay diferencias entre tratamientos (marcadas y control; $P < 0.0001$) (figura 7-5A) y entre metabolitos ($P < 0.0001$) (figura 7-5B), así como diferencias en *F* ($P = 0.0017$) (figura 7-4A) y peso seco de los diferentes tipos de frutos ($P = 0.0162$) (figura 7-5D). En éste análisis general no se encontraron diferencias entre genotipos ($P = 0.0765$) (figura 7-5C) ni en *R* ($P = 0.3738$) (Anexo 7-2).

Figura 7-5: Diferencias en la relación isotópica (*RI* - $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) entre tratamientos (**A**), entre metabolitos (**B**), entre genotipos (**C**), y en el peso seco (g) entre tipos de frutos (**D**). Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar.



El resultado en la *RI* entre plantas marcadas (0.0130838) y control (0.0127644) permite aseverar que la metodología de marcación con $^{13}\text{CO}_2$ bajo condiciones de campo fue adecuada (figura 7-5A).

Se encontró un comportamiento similar en la respuesta de *RI* para los metabolitos sintetizados secuencialmente por las plantas con respecto al experimento dos, que refuerza los resultados de ambos. Los compuestos formados primero y en mayor medida fueron los azúcares totales ($RI=0.0189517$) seguidos por el almidón ($RI=0.0167207$) con diferencias estadísticas entre ellos; luego los lípidos ($RI=0.015216$) y el material orgánico ($RI=0.014898$) los cuales fueron iguales; por último, y con los menores valores, las proteínas totales ($RI=0.012031$) y la celulosa ($RI=0.0126572$), sin hallar diferencias entre ellos, más sí con los demás compuestos (figura 7-5B) (anexo 7-2). El orden de magnitud de *RI* en cada uno de los grupos de compuestos estudiados, muestra la confiabilidad del método para seguir la dinámica funcional y metabólica del carbono y la secuencia lógica de eventos que se asocian con el metabolismo, en cuanto a la construcción de moléculas cada vez más complejas.

Si bien no hubo diferencias estadísticas en *RI* entre los dos genotipos evaluados ($CU1970=0.0155129$ y $BH1409=0.0146453$, anexo 7-2) se observa en la figura 7-5C que el primer material tuvo un valor promedio superior con respecto al segundo. En los análisis posteriores se encontró en cuales metabolitos y procesos los materiales son iguales o diferentes estadísticamente.

7.4.2 Cuantificación de los compuestos asociados con el metabolismo del carbono en los diferentes tipos de frutos

Se cuantificaron en los diferentes tipos de frutos los almidones ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$), azúcares totales ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$), proteínas totales ($\text{mg g}^{-1} \text{ PS}$), celulosa ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$) y lípidos (%). Hubo una respuesta dinámica en los metabolitos analizados, encontrando mayores valores en aquellos frutos que mostraban mayor desarrollo y crecimiento. Así, se encontró mayor cantidad de almidón, proteína total y celulosa en los frutos *F3*. Los *F2* fueron mayores que los *F1* en almidones y celulosa, mientras que las proteínas totales fueron mayores en los *F1* que los *F2*. La cuantificación de los azúcares totales fue estadísticamente igual en los tres tipos de frutos (figura 7-6).

El análisis mostró que la sacarosa fue estadísticamente mayor en los *F3*, seguida por los *F2* y *F1* que no fueron diferentes. Los mayores valores de glucosa se encontraron en los *F1* y *F2*, seguidos por los *F3*, el cual no obtuvo diferencias con *F1*, y para la fructosa no se encontraron diferencias, si bien los *F1* y *F3* tuvieron mayores valores (figura 7-7).

Figura 7-6: Contenido de almidón ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$), azúcares totales ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$), proteínas totales ($\text{mg g}^{-1} \text{ PS}$) y celulosa ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$), en los diferentes tipos de frutos (*F1*, *F2* y *F3*) para plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® en el campo. Promedios con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tipos de frutos. $n=3$ para cada metabolito y tipo de fruto.

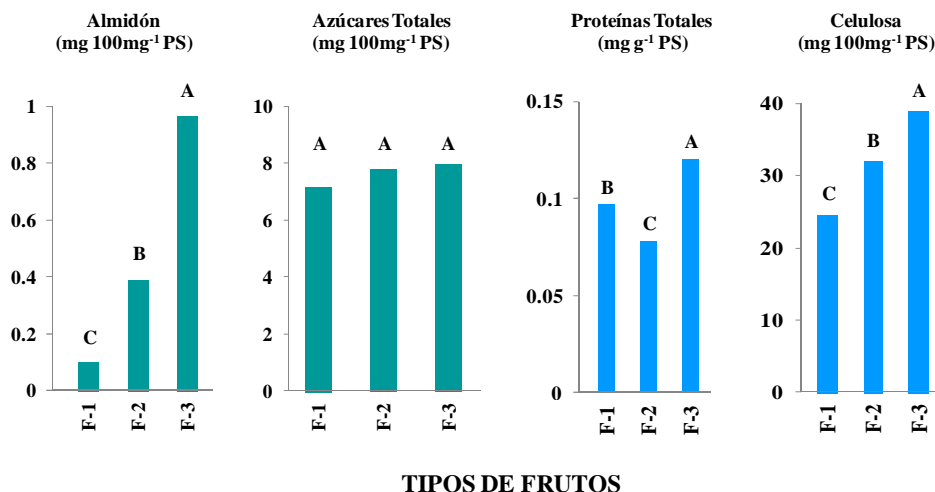
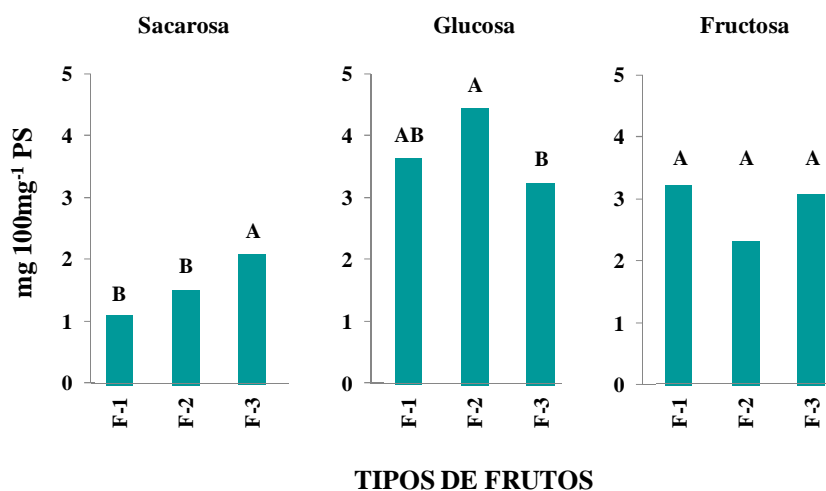
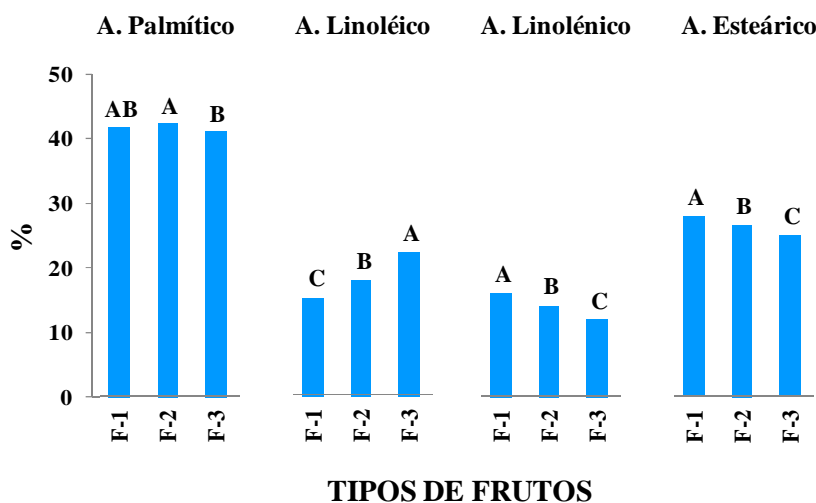


Figura 7-7: Contenido promedio de sacarosa, glucosa y fructosa ($\text{mg } 100\text{mg}^{-1} \text{ PS}$) en los diferentes tipos de frutos (*F1*, *F2* y *F3*) para plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® en el campo. Promedios con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tipos de frutos. $n=3$ para cada metabolito y tipo de fruto.



Los ácidos grasos presentaron una dinámica diferente a lo encontrado en las hojas del experimento dos. El ácido palmítico presentó los mayores valores porcentuales (40%). Los ácidos esteárico, linoléico y linolénico los siguieron en su orden (25, 20 y 15% respectivamente), encontrando diferencias entre los tipos de frutos. Hubo mayor cantidad de ácido linoléico en la medida que el fruto crece y se desarrolla, en tanto los ácidos linolénico y esteárico fueron mayores cuando los frutos estaban en sus etapas iniciales de desarrollo y disminuyeron con el tiempo. Hubo concentraciones importantes de los últimos tres ácidos a lo largo del período de evaluación de los frutos, lo cual podría ser tenido en cuenta en posteriores trabajos de investigación, debido a sus propiedades antioxidantes (figura 7-8).

Figura 7-8: Contenido promedio de ácidos palmítico, linoléico, linolénico y esteárico (%) en los diferentes tipos de frutos (F1, F2 y F3) para plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® en el campo. Promedios con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tipos de frutos. n=3 para cada metabolito y tipo de fruto.

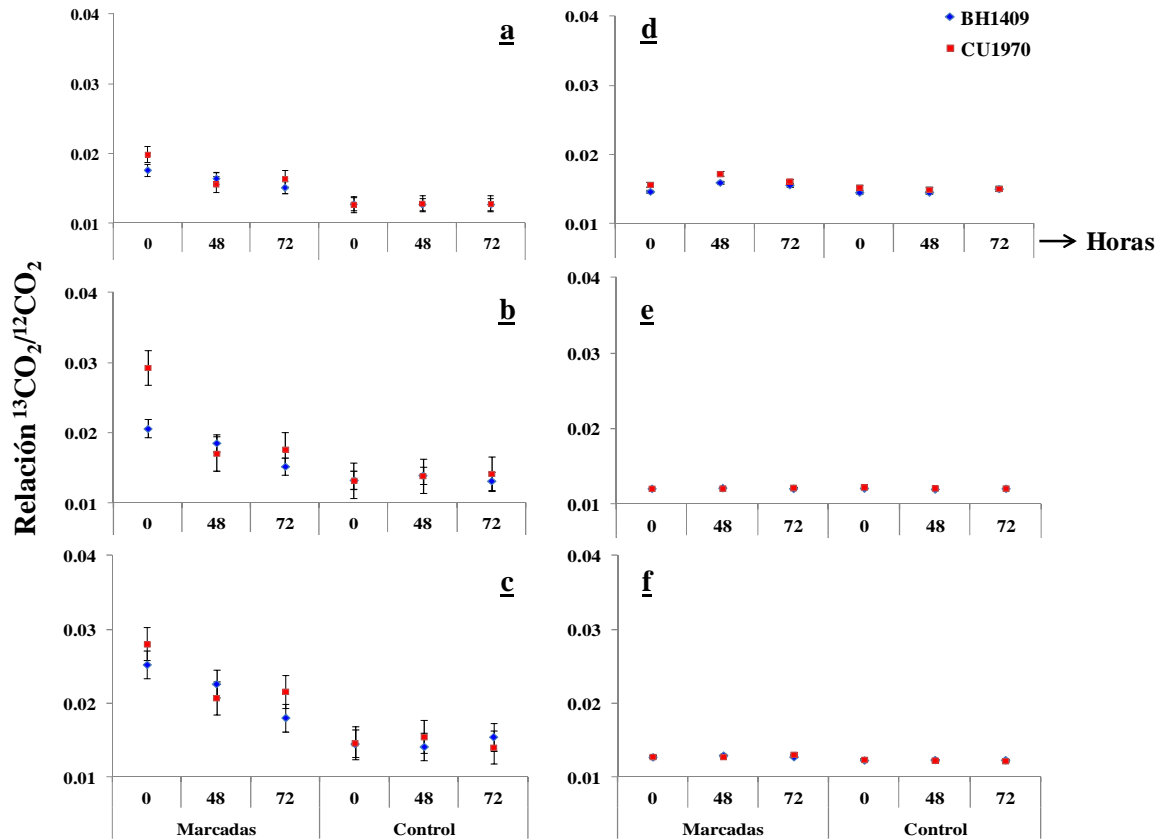


7.4.3 Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en las hojas

La dinámica de la RI de los principales productos del metabolismo en las hojas (figura 7-9) fue similar a la obtenida para el mismo órgano en el experimento dos. Este resultado sustenta la información de ambos experimentos en términos de la metodología utilizada tanto para la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, como para los tiempos de evaluación de las variables propuestas.

Se observó desde el inicio del experimento marcación de la MO , almidones y azúcares totales (figuras 7-9a, 7-9b y 7-9c) con respecto al control. En la medida que transcurrió el tiempo los valores de RI se hicieron menores, sugiriendo la exportación de asimilados desde las hojas hacia órganos vertederos, en particular frutos. Este comportamiento coincide con lo discutido en el anterior experimento, al obtener valores intermedios para la MO , ya que es un valor promedio de todos los metabolitos marcados, y valores superiores para almidones y azúcares totales, pues estos son los primeros compuestos sintetizados a partir del CO_2 que ingresa por F en las hojas. No hubo diferencias entre genotipos en los dos tratamientos, excepto el almidón en el genotipo *CU1970* el cual fue mayor estadísticamente que el *BH1409* en el tiempo 0. Se observó que en ninguno de los metabolitos, a las 72 horas posteriores a la marcación, hubo diferencias entre plantas marcadas y control, lo cual podría ser consecuencia de un metabolismo activo y exigente en compuestos ricos en energía, que hace que los compuestos marcados inicialmente sean metabolizados y distribuidos en las primeras 72 horas, similar a lo ocurrido a los 35°C en el experimento dos.

Figura 7-9: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en las hojas de plantas marcadas y control: material orgánico (**a**), almidón (**b**), azúcares totales (**c**), lípidos (**d**), proteínas (**e**) y celulosa (**f**), a las 0, 48 y 72 horas posteriores a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, genotipos *BH1409* y *CU1970*. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada genotipo, tiempo y tratamiento.



Los tres compuestos restantes mostraron menores valores de RI que los almidones y azúcares totales. Los lípidos obtuvieron diferencias con el control únicamente a las 48 horas posteriores a la marcación con valores estadísticamente superiores para el material *CU1970* (figura 7-9d). Los menores valores de RI fueron obtenidos por las proteínas y la celulosa, sin diferencias estadísticas con respecto al control (figuras 7-9e y 7-9f respectivamente).

7.4.4 Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas

Para describir la dinámica en la marcación de los principales compuestos del metabolismo bioquímico (MO , almidón, azúcares totales, lípidos, proteínas totales y celulosa) en hojas y frutos, y de MO en las ramas, se desarrollaron modelos espaciales que permitieron explicar la RI , en respuesta a la interacción entre F , R , peso seco de los frutos y tiempo, de tal manera que reflejara su importación y exportación.

7.4.4.1 Análisis de superficies para plantas marcadas - HOJAS

Como componente fundamental del sistema Fuente-Demanda, y debido a que se encontraron diferencias estadísticas entre F (actividad de la fuente) y R (actividad de la demanda), el análisis de superficies para las hojas se realizó considerando la respuesta de la RI de cada metabolito, a cada uno de éstos dos componentes del IG .

Independiente del tiempo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$, el comportamiento de la fuente, medida como F , mostró que a mayor actividad mayor marcación de la MO y los azúcares totales (figuras 7-10A y 7-10C respectivamente). La dinámica presentada por los azúcares fue similar a la de la MO lo cual podría indicar, tal como sucedió en el experimento dos, la preponderancia de estos carbohidratos en el metabolismo total. El almidón presentó una respuesta diferente (figura 7-10B) (anexo 7-3).

Independiente de la actividad de la demanda, valorada como R , en la medida que el tiempo transcurrió entre la marcación y 72 horas después, la MO y los azúcares totales disminuyeron la RI , lo que puede ser un indicio de la dinámica respiratoria, de tal manera que los órganos de demanda deben importar compuestos cargados energéticamente para su propio metabolismo. Similar a lo ocurrido con F , los azúcares totales y la MO presentaron la misma dinámica metabólica, lo que confirma la importancia de este compuesto en el metabolismo vegetal. La dinámica observada en los almidones (figura 7-10B) sugiere la alternancia de los ciclos día-noche, previamente mencionados, en los cuales hay síntesis y degradación de acuerdo con los requerimientos energéticos. Los modelos obtenidos y su significancia estadística se presentan en los anexos 7-3, 7-4 y 7-5, los cuales presentaron coeficientes de determinación alrededor del 50%.

Los modelos obtenidos para la RI de los lípidos, en respuesta a los componentes del IG (F y R), mostraron significancia solo para la R (anexo 7-6; $R^2=38\%$). Sin embargo, en la figura 7-11D se observa una clara tendencia de su metabolismo posterior a la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ diferencial. En la medida que el tiempo transcurre, a mayor actividad de la fuente y la demanda (F y R respectivamente), hay mayor detección del compuesto marcado, lo que podría indicar de alguna manera que en el lapso de 72 horas hay síntesis y degradación del mismo en las hojas, posiblemente como fuente de energía para los procesos de biosíntesis celular, a diferencia de las proteínas y la celulosa, los cuales no presentaron significancia estadística ni diferencias con el control (figuras 7-11E y 7-11F) (anexos 7-7 y 7-8).

Figura 7-10: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el material orgánico (**A**), almidón (**B**) y azúcares totales (**C**) en hojas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, fotosíntesis (F) y respiración (R).

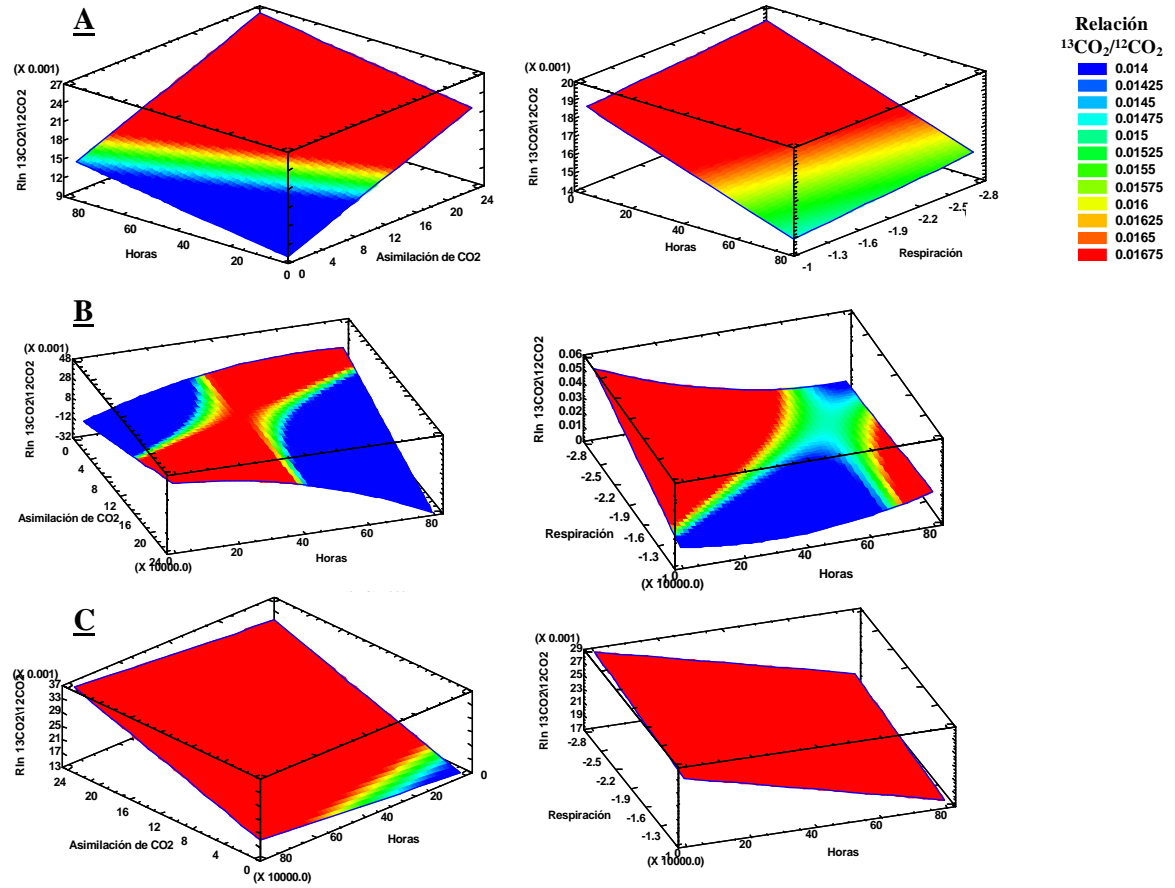
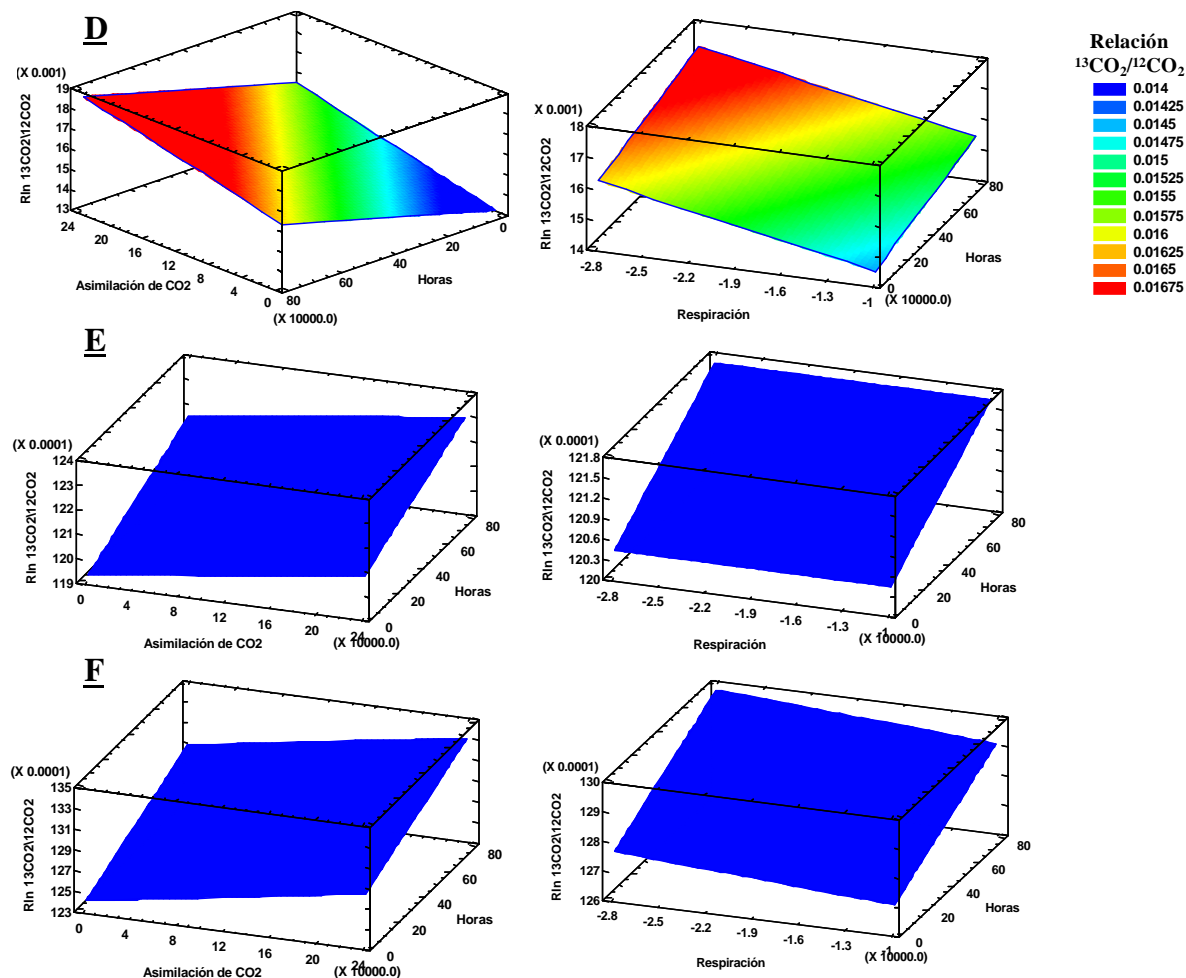


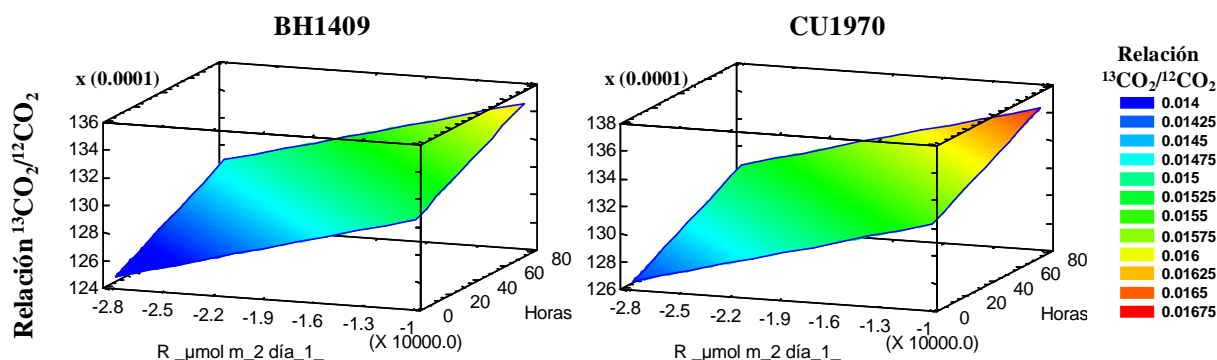
Figura 7-11: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los lípidos (**D**), proteínas (**E**) y celulosa (**F**) en hojas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, fotosíntesis (F) y respiración (R).



7.4.5 Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el material orgánico de las ramas

En las ramas se evaluó la respuesta de la RI al tiempo y a la R en el MO . El modelo general que describe su respuesta tuvo significancia ($P=0.0035$) con un R^2 de 60.98%. A pesar de no encontrar diferencias entre genotipos ($P=0.1599$), si se encontró una respuesta de la actividad de la demanda R ($P=0.0152$) (Anexo 7-9). No obstante los bajos valores de RI , similares a los encontrados en proteínas y celulosa en las hojas, hay mayor detección de compuestos marcados cuando R es menor y hacia el final del experimento, lo que insinúa la detección de compuestos que están siendo exportados a través de los haces vasculares de las ramas, en particular azúcares, hacia el vertedero. Igualmente se detectó mayor cantidad de compuestos marcados para el material *CUI970* (figura 7-12), que explicaría parcialmente la mayor acumulación de biomasa, con respecto al material *BH1409*, desde el inicio de su ciclo de vida.

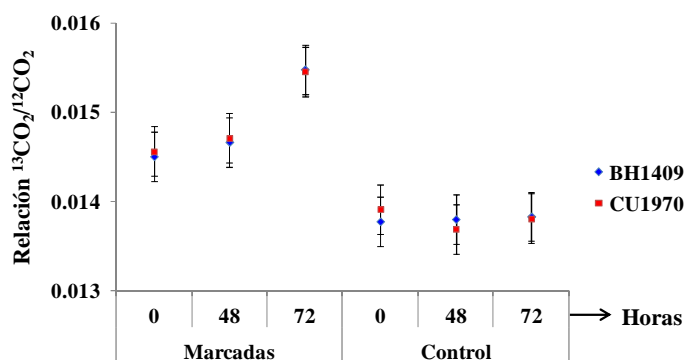
Figura 7-12: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en la *MO* de las ramas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$ y respiración (R).



7.4.6 Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los principales productos del metabolismo en los frutos

La *RI* encontrada en la *MO* de los frutos totales, a las 0, 48 y 72 horas posteriores a la marcación, se presentan en la figura 7-13. Se observa una clara diferencia entre tratamientos a lo largo de todo el experimento lo cual insinúa, de un lado, la eficacia de la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$ diferencial, y de otro lado, el comportamiento vertedero de los frutos, puesto que la *RI* incrementó su valor con el tiempo, independiente del genotipo evaluado. El anava presentado en el anexo 7-10 reportó alta significancia ($p < 0.0001$) y un coeficiente de determinación de 77.4% del modelo general, así como diferencias en el tiempo, metabolito evaluado, peso seco de acuerdo con el tipo de fruto ($F1$, $F2$, $F3$) y el proceso de R . Debido a la alta relación existente entre F y R (colinealidad), se decidió incluir en el anava la R como proceso explicativo del movimiento de los asimilados hacia la demanda.

Figura 7-13: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el material orgánico de los frutos totales, para los tratamientos marcados y control, a las 0, 48 y 72 horas posteriores a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, en los genotipos BH1409 y CU1970. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada genotipo, tiempo y tratamiento.



Al realizar el análisis de la *RI* de los metabolitos por tipo de fruto, entre las 0 y las 72 horas posteriores a la marcación, se observó una tendencia a mayor acumulación de $^{13}\text{CO}_2$ en los *F1*, seguidos por los *F2* y *F3*. En general hubo diferencias con el control a las 72 horas posteriores a la marcación, es decir, entre las 0 y las 48 horas aún los frutos no habían importado metabolitos marcados, aunque es posible que al interior del aparato fotosintético hubiera ingresado $^{13}\text{CO}_2$ por la fotosíntesis de los mismos frutos, pero en una proporción tal que no alcanzó a diferenciarse del control. Los valores de *RI* en los almidones de los *F1* y *F3* fueron superiores al control solo al final del experimento (figura 7-14b), mientras para los azúcares los *F1* ya desde las 48 horas mostraron diferencias con el control, en tanto los *F2* y *F3* la mostraron solamente a las 72 horas posteriores a la marcación (figura 7-14c). Es interesante notar que, a diferencia de lo sucedido en las hojas, los lípidos si mostraron diferencias estadísticas con respecto al control, en particular los *F1* y *F2* a las 72 horas y los *F3* únicamente a las 48 horas (figura 7-15d). En cuanto a las proteínas no hubo una clara diferenciación de la marcación con respecto al control, tal como sucedió con las hojas de los experimentos dos y tres de este trabajo, en los cuales hubo una muy baja o nula marcación de este metabolito (figura 7-15e). A diferencia de la consideración anterior, hubo una clara marcación de la celulosa en algunas de las variables de respuesta evaluadas. Así, tanto los *F1* como *F2* y *F3* aumentaron el valor de *RI* con respecto al control, a las 72 horas posteriores a la marcación, mostrando así la síntesis, fundamentalmente, de pared celular para el desarrollo y crecimiento de estos órganos de demanda (figura 7-15f).

Figura 7-14: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los diferentes tipos de frutos ($F1$, $F2$ y $F3$) de plantas marcadas y control para: material orgánico (**a**), almidón (**b**) y azúcares totales (**c**), a las 0, 48 y 72 horas posteriores a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, en los genotipos *BH1409* y *CU1970* de *Coffea arabica* L. var. Castillo®. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada genotipo, tiempo y tratamiento.

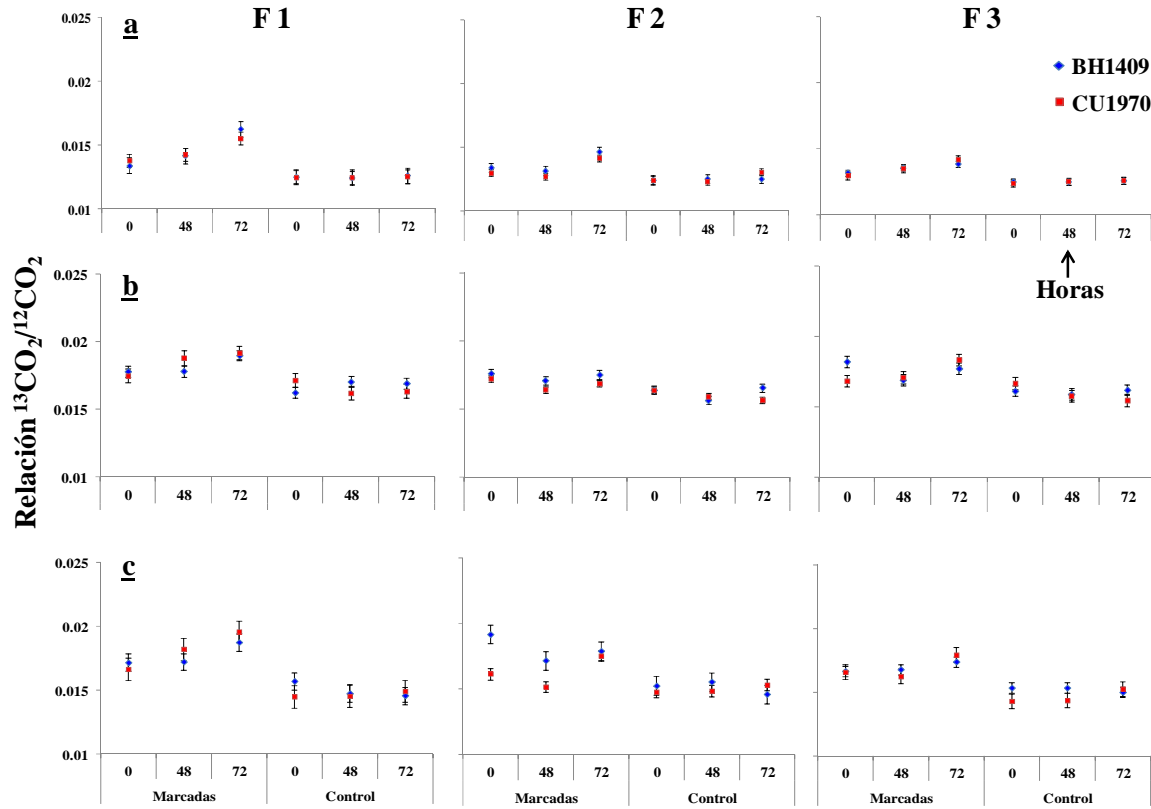
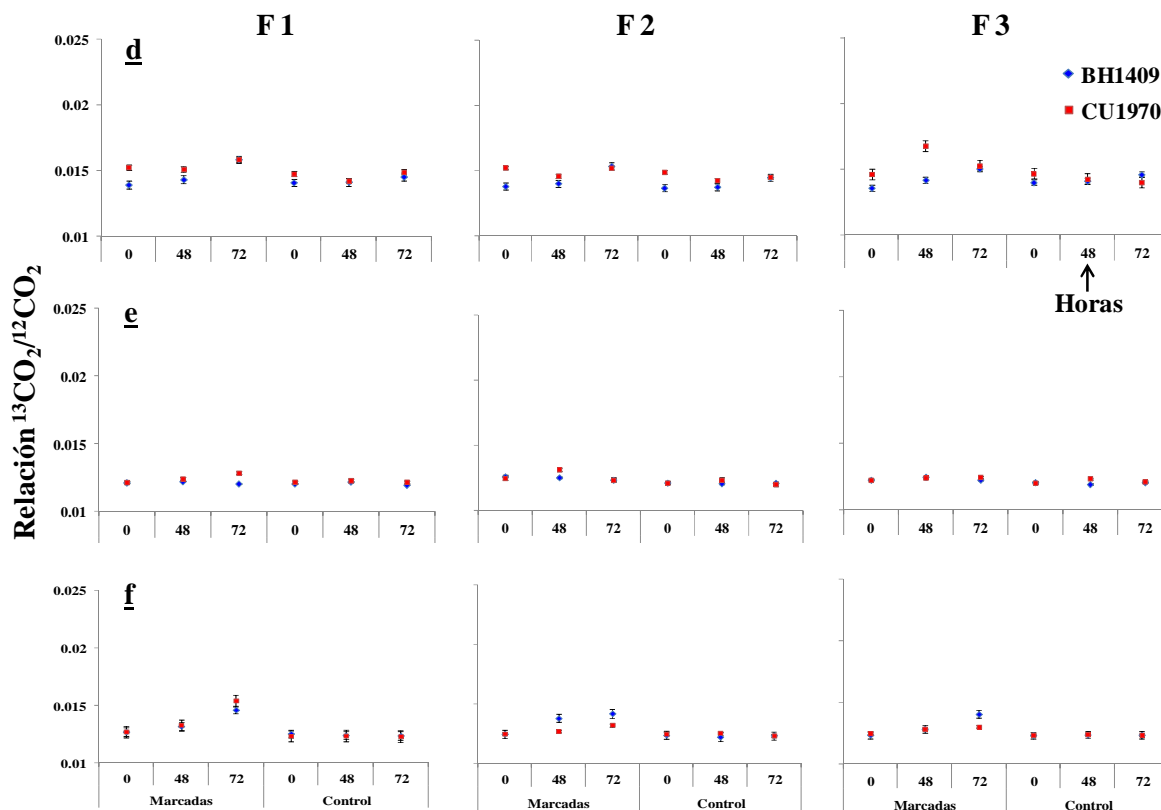


Figura 7-15: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los diferentes tipos de frutos ($F1$, $F2$ y $F3$) de plantas marcadas y control para: lípidos (**d**), proteínas totales (**e**) y celulosa (**f**), a las 0, 48 y 72 horas posteriores a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, en los genotipos *BH1409* y *CU1970* de *Coffea arabica* L. var. Castillo®. Los símbolos muestran el promedio y las barras verticales el error estándar. $n=3$ para cada genotipo, tiempo y tratamiento.

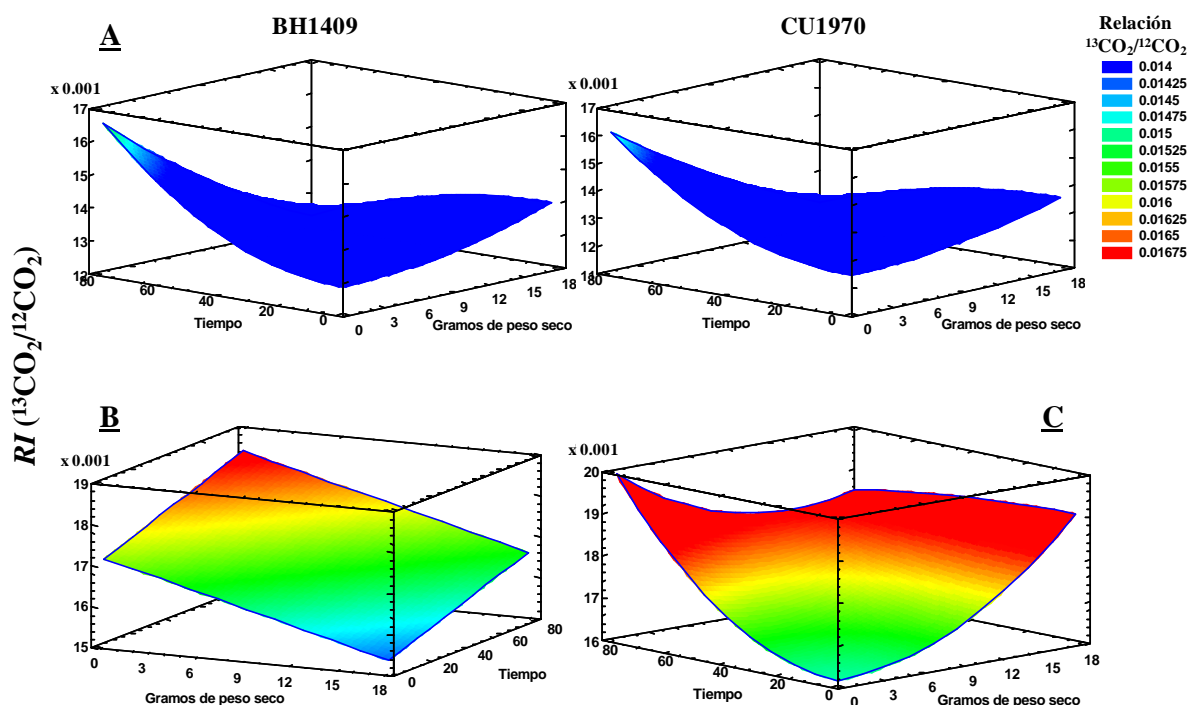


7.4.6.1 Análisis de superficies por metabolito para plantas marcadas - FRUTOS

Se adelantó un Anava general en la que se analizó cuales factores influyeron en la RI . El modelo general fue altamente significativo ($P < 0.0001$) con un R^2 de 77.4%. Hubo significancia de los metabolitos, tratamientos, tiempo, peso seco y respiración. En ésta análisis general no se encontraron diferencias entre genotipos ($P = 0.0991$) (anexo 7-10).

La separación en el análisis estadístico por metabolito detectó diferencias entre genotipos en la MO , los lípidos y las proteínas, mientras en almidones, azúcares totales y celulosa no se encontraron. Se generaron modelos espaciales para cada genotipo cuando hubo diferencias entre ellos. Para cada metabolito se generó el modelo de respuesta del comportamiento de la RI en función de la interacción entre el peso seco y el tiempo, lo que permitió comprender el proceso en términos del tamaño de la demanda y su influencia sobre la fuente para importar asimilados fotosintéticos.

Figura 7-16: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en el material orgánico de los genotipos *BH1409* y *CU1970* (**A**), almidón (**B**) y azúcares totales (**C**) en frutos de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$ y peso seco.

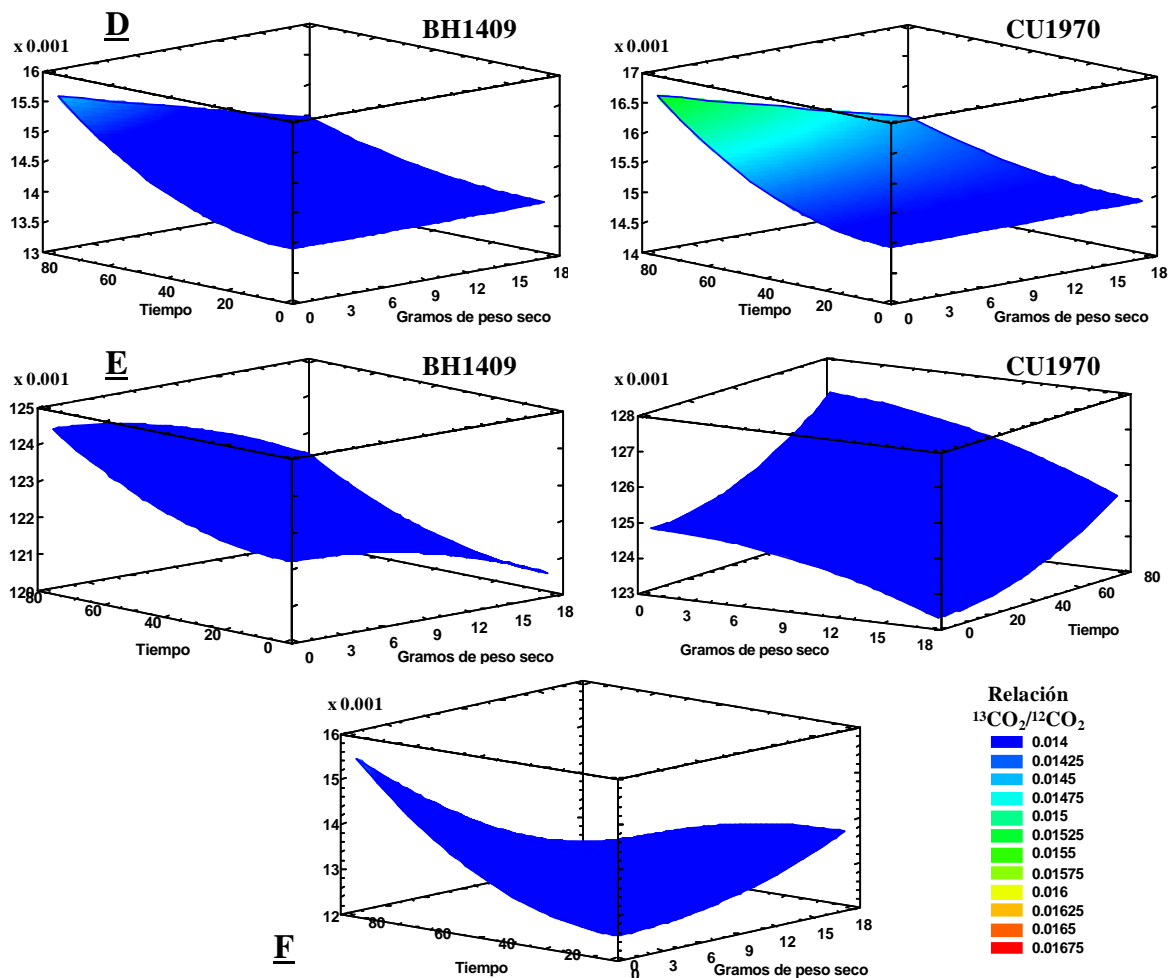


Los *F1* acumularon la mayor cantidad de almidón y azúcares totales en el transcurso del experimento (figuras 7-16B y 7-16C), seguidos por los frutos tipo 2 y 3 respectivamente. Los modelos que explican este comportamiento, incluyendo la *MO* de cada genotipo (figura 7-16A), los cuales tuvieron significancia estadística, se observan en los anexos 7-11, 7-12 y 7-13. Se destaca que la respuesta en la síntesis de almidones y azúcares totales fue estadísticamente igual para ambos genotipos.

Para los lípidos, independiente del peso seco de los frutos, al inicio del experimento todos mostraron los mismos valores de *RI* (figura 7-17D). Con el tiempo la fuerza de demanda de los frutos de menor desarrollo se manifestó al obtener sobre las 72 horas los mayores valores. Se encontraron diferencias entre genotipos para este metabolito y para las proteínas (figuras 7-17D y 7-17E) (anexos 7-14 y 7-15), que sugieren alta influencia en el material orgánico total, ya que la dinámica de sus comportamientos fue similar. Quizás la mayor detección de lípidos marcados para los frutos de menor crecimiento y desarrollo en el material *CU1970*, frente al material *BH1409*, permita explicar en parte la mayor producción de este genotipo a lo largo de su ciclo. Los *F2* mostraron un comportamiento intermedio para este metabolito, seguidos por los *F3*. No se encontró significancia en el modelo general que describe la respuesta de *RI* a las proteínas ($P=0.029$), sin embargo si se manifestaron diferencias entre genotipos ($P=0.0178$) (figura 7-17E). Igualmente hubo mayores valores de *RI* en los *F1*, seguidos por los *F2* y *F3* respectivamente, y un aumento sostenido entre las 0 y 72 horas, que refleja la importación continua de carbohidratos provenientes del metabolismo foliar.

La celulosa, cuyo modelo evidenció significancia estadística ($P < 0.0001$; $R^2 = 46.8\%$) (figura 7-17E, anexo 7-16), mostró que, independiente del peso de los frutos al inicio del experimento, mayor importación de metabolitos marcados desde la fuente por los *F1*, los cuales permitieron la mayor división y elongación celular, menores valores para los *F2* y aparentemente nulo para los *F3*, los cuales al encontrar en sus últimas etapas de desarrollo y crecimiento no acumula más materia seca.

Figura 7-17: Relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) en los lípidos (**D**) y las proteínas (**E**) en los genotipos *BH1409* y *CU1970*, y la celulosa (**F**) en frutos de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® y su respuesta a la interacción entre el tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$ y peso seco.



7.5 Discusión

7.5.1 Comportamiento de la temperatura, variables climáticas asociadas, intercambio gaseoso (*IG*) y relación isotópica (*RI*)

Las condiciones de $T^{\circ}\text{C}$ y RFA [$\mu\text{mol}_{(\text{fotones})}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] durante el experimento fueron las habituales para la localidad y permitieron que el *IG*, medido en las hojas de los nudos 1 al 5 en ramas similares a las marcadas con $^{13}\text{CO}_2$, en *Coffea arabica* L. var. Castillo[®] genotipos *BH1409* y *CU1970*, tuvieran un comportamiento normal, de tal manera que al hacer el balance entre F y R , la fotosíntesis neta (F_n) fué positiva, lo que debe traducirse en ganancia de biomasa y peso seco, como consecuencia de la dinámica de los asimilados al interior de la estructura foliar.

Los valores de F_n encontrados a favor del material *CU1970* [$99798 \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] frente al *BH1409* [$87920 \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$] coinciden con una mayor acumulación de biomasa y producción del primero a lo largo de su ciclo de vida. Lo anterior permite corroborar algunos de los resultados obtenidos en el segundo experimento, donde bajo condiciones adecuadas de $T^{\circ}\text{C}$, el material *CX2178* (que es igual al *CU1970*) obtuvo las mayores tasas de F y R así como mayor acumulación de materia seca. El genotipo *BH1247* (que es igual al *BH1409*) obtuvo menores tasas de F y R , y en consecuencia, permite inferir que este comportamiento se verá reflejado en la menor acumulación de materia seca total, incluidos los frutos, durante su ciclo de vida, como ha sido demostrado por Alvarado *et al.* (2005) en estudios sobre la producción de estos materiales.

El hecho de no haber encontrado diferencias estadísticas significativas en F ($P=0.0503$) y R ($P=0.3712$) entre ramas marcadas y control, asegura que la intervención a la planta para la marcación con $^{13}\text{CO}_2$ no afectó su comportamiento fisiológico. Igualmente el valor de RI para las plantas marcadas (0.0130838) con respecto al control (0.0127644) ($P<0.0001$), confirma la utilidad de la metodología desarrollada para seguir la dinámica de los principales componentes bioquímicos y estructurales del metabolismo del carbono (figura 7-5A). Las diferencias entre los principales compuestos del metabolismo bioquímico y el orden de su síntesis fue semejante a los resultados del experimento dos, que infirió homogeneidad en la aplicación de los tratamientos y la evaluación de las variables exploradas (figura 7-5B). La igualdad estadística para la RI entre los materiales ($P=0.0765$) hace pensar en un comportamiento similar entre ambos, sin embargo los valores del genotipo *CU1970* fueron superiores que *BH1409* (figura 7-5C), lo cual podría tener relación con el balance de F_n mencionado.

Las diferencias halladas en el peso seco de los frutos ($P=0.0162$, anexo 7-2, figura 7-5D) permitió integrar en el análisis el tamaño de la demanda, a través de la biomasa de los frutos, y la influencia que ejerció en la importación de asimilados marcados en el proceso de F .

En general los resultados presentados en la figura 7-5 guardan similitud con aquellos obtenidos en el experimento dos (anexo 7-2), lo que permite inferir que experimentos semejantes, bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento, permiten explicar adecuadamente lo que sucede con la bioquímica y el metabolismo en plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo[®] El Rosario en campo.

7.5.2 Cuantificación de los metabolitos analizados

La cuantificación de los metabolitos presentó una dinámica que es lógica de acuerdo con el estado de desarrollo y crecimiento de los frutos. Si se sigue la curva de crecimiento y peso seco obtenida por Salazar *et al.* (1994a y b), se encuentra que se evaluaron frutos en tres estados diferentes, según lo anotado en el aparte de materiales y métodos. Los *F1* son frutos entre 1 y 8 semanas de desarrollo, los *F2* entre 9 y 17 semanas, y finalmente los *F3* entre las semanas 18 y 26 (figura 7-1G). Cada una de estas etapas se caracteriza porque su estructura interna y externa es diferente, de tal forma que la respuesta fisiológica a las condiciones ambientales hacen que su metabolismo no sea igual, influyendo así en la relación Fuente-Demanda entre los tipos de frutos y las hojas, que en este caso, participaron en el seguimiento del $^{13}\text{CO}_2$ (Salazar, 1993; Salazar *et al.*, 1994a, b; Mosquera *et al.*, 1997; Ocampo, 2003). De igual manera, la dinámica entre fuente y demanda de asimilados con base en el desarrollo de los frutos, ejerce alta influencia en los procesos de *F* y *R* (Ocampo, 2003; Matsuda *et al.*, 2011), así como en la transpiración, que permite el movimiento del agua y los minerales entre el suelo, la planta y la atmósfera, que tiene implicaciones en la fuerza de los frutos para atraer savia elaborada (Morandi *et al.*, 2010, 2011).

Los frutos de mayor desarrollo (*F3*) presentaron las mayores proporciones de almidones, proteínas y celulosa. Lo anterior esta en acuerdo con Dentan (1985) quien encontró en frutos de café de 100-130 días de edad amiloplastos gigantes con altos contenidos de almidón, y posterior a ello, material de almacenamiento como lípidos, proteínas y polisacáridos. Igualmente Laviola *et al.* (2007) encontraron que el almidón fue mayor cuando los frutos se encontraban en estado de rápida expansión (semanas 16-18), es decir, en las primeras semanas de desarrollo de los *F3*, lo cual coincidió con una rápida disminución en la cantidad de carbohidratos en las hojas del tercer y cuarto nudo, indicando que es el período más crítico para la concentración de carbohidratos en esos órganos. Los *F3* fueron seguidos en la concentración de los metabolitos mencionados por los *F2* y *F1* respectivamente, siendo normal por su estado de desarrollo.

Son varios los reportes experimentales en los que se ha encontrado que los frutos fotosintetizan hasta un 30% del total de la planta, haciendo parte del balance general de acumulación de biomasa, tanto de ellos mismos, como del resto del vegetal (Ocampo, 2003; Cunha, 2007). Sin embargo, otros autores como Buchanan *et al.* (2000), sugieren que la principal función de los cloroplastos en los frutos es la biosíntesis de metabolitos por el CO_2 respiratorio reciclado, más que una función fotosintética.

Los azúcares totales no presentaron diferencias en concentración entre los tres tipos de frutos, lo que sugiere la importancia de estos metabolitos en todo su ciclo de desarrollo, y más aún, en el balance general de producción total de la planta. Sin embargo, hubo mayor cuantificación de glucosa y fructosa que de sacarosa, lo que implicaría diferentes situaciones. Una, y coincidente con el experimento dos en el cual se encontró mayor concentración de glucosa y fructosa en el tallo como órgano de transporte, es que los frutos importen los mismos metabolitos preferentemente. La otra sería que hacen parte de la dinámica de degradación de la sacarosa hacia glucosa y fructosa una vez esta es importada por los frutos, por acción bien sea de las invertasas o de la sacarosa sintasa (*SS*), enzimas que participan en la degradación de este compuesto, tal como Geromel *et al.* (2006) lo reportaron.

El ácido palmítico estuvo presente en los tres tipos de frutos sin diferencias entre ellos, con porcentajes mayores a los observados en las hojas del experimento dos, que sugiere su importancia en el metabolismo de este órgano. De la misma manera hubo presencia de los ácidos esteárico, linoléico y linolénico, los cuales fueron porcentualmente diferentes a lo encontrado en hojas, y con diferencias entre los tipos de frutos. Hubo mayor concentración de ácido linoléico en la medida que el fruto crece y se desarrolla, en tanto los ácidos linolénico y esteárico fueron mayores cuando los frutos estaban en sus etapas iniciales de desarrollo y disminuyeron con el tiempo. No se encontraron reportes en la literatura para *Coffea* sp. en los que se evalúe la concentración de estos compuestos a través del desarrollo del fruto con sus estructuras como un todo. La gran mayoría hacen referencia al estudio de los lípidos cuando ya el endospermo ha sido procesado hasta el punto conocido como café verde (para exportación comercial) o cuando la misma ha sufrido el proceso de tostación. Por la tanto la información obtenida en este experimento podría ser interesante para entender en términos fisiológicos la dinámica de los lípidos a través del desarrollo del fruto y su influencia en la bebida final. Igualmente se encontraron concentraciones altas de ácidos esteárico, linoléico y linolénico a lo largo del período de evaluación de los frutos (0-24 semanas), lo cual debe ser tenido en cuenta en posteriores trabajos de investigación, debido a las propiedades antioxidantes de estos compuestos.

7.5.3 Comportamiento de la relación isotópica ($RI - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2$) y dinámica Fuente-Demanda en los metabolitos y órganos analizados

El presente experimento aporta información para entender como es la dinámica entre fuente y demanda de asimilados fotosintéticos cuando las plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo El Rosario[®] genotipos *BH1409* y *CU1970* se encuentran es estado reproductivo, y como de acuerdo con el desarrollo y crecimiento de los frutos, principales órganos de importancia económica, participan en dicha dinámica, con el fin de importar compuestos ricos en energía, y así fabricar los esqueletos de carbono que permitirán la división y elongación celular hasta alcanzar su máximo tamaño, así como para fabricar y obtener las mejores características sensoriales que serán trasladadas al consumidor final.

Se observó una respuesta clara de las hojas y los frutos como órganos fuente y demanda de asimilados. Igual a lo encontrado en el segundo experimento, los mayores valores de RI en las hojas fueron obtenidos por los almidones y los azúcares totales, de tal manera que al relacionarlos con la F , la R y el tiempo posterior a la marcación con ${}^{13}\text{CO}_2$, evidenciaron la dinámica propia de órgano fuente, ya que con el tiempo fueron exportados hacia los frutos. El almidón evidenció lo que sucede en las hojas en respuesta a los ciclos diurnos y nocturnos de síntesis y degradación, de tal manera que durante las 72 horas evaluadas se observó que a mayores tasas de F y R , mayores valores de RI se presentaron, con la diferencia que para la F , la forma del modelo muestra su síntesis, en tanto para la R el modelo muestra su degradación, comportamiento normal del metabolismo de los almidones en las hojas de las diferentes especies (figura 7-10B).

La forma de los modelos de F y R para los azúcares totales (figura 7-10C) fue similar a la observada para el MO (figura 7-10A), lo cual respalda lo observado para las hojas del experimento dos, donde se discute su importancia, particularmente la sacarosa, glucosa y fructosa, en el componente total del MO , así como en la importación y exportación de compuestos ricos en energía, que permiten el desarrollo y crecimiento de las plantas. En el caso de la asimilación de CO_2 , independiente del tiempo, mayores valores de F reflejaron mayores valores de RI en los azúcares totales, lo cual sería una evidencia de la síntesis de estos compuestos, los que por efecto de la demanda de los frutos, deben estar siendo sintetizados en altas cantidades (figuras 7-6 y 7-7). Por el contrario, independiente de la tasa de R , en la medida que el tiempo transcurrió, los valores de RI fueron menores, sugiriendo su degradación y exportación hacia los frutos (figura 7-10C).

Los valores de RI para los lípidos en las hojas aumentaron en el tiempo, tanto para F como para R , indicando síntesis del compuesto, lo que insinúa, con respecto a los almidones y a los azúcares, un metabolismo más lento y complejo, donde el tamaño y la fuerza de la demanda no exige su participación en procesos degradativos que contribuyan a su desarrollo, sino mas bien, participan en la construcción de diferentes compuestos y estructuras, en particular para el intercambio de sustancias entre células, como los fosfolípidos de membrana (figura 7-11D). Las proteínas y la celulosa mostraron los valores más bajos de RI entre todos los compuestos analizados, sin diferencias con el control; sin embargo la forma de los modelos descritos para ambos, sugieren para F que a mayores valores hay mayor detección del compuesto marcado en el tiempo, mientras que independiente de la R , con el tiempo hay valores igualmente superiores. Lo encontrado para estos metabolitos podría indicar una dinámica más compleja en su síntesis, así como necesidades energéticas de las hojas más enfocadas hacia compuestos de fácil degradación y exportación, como almidones y azúcares. Igualmente, la información permite diferenciar la respuesta de la síntesis de los compuestos a la F y la R , evidenciando su papel de fuente y demanda respectivamente, y como el primero participa anabólicamente reduciendo hidratos de carbono, mientras el segundo lo hace catabólicamente oxidando los compuestos previamente reducidos, como lo sugieren Taiz y Zeiger (2002).

Los frutos se comportan como órganos vertederos (figura 7-13). Con el tiempo, independiente del genotipo ($P=0.0991$) los valores de RI aumentaron, lo que coincidió con una disminución de la RI para el almidón y los azúcares de las hojas. Al analizar la función vertedero de los frutos de acuerdo con su edad, la cual está asociada a su desarrollo y crecimiento, la respuesta fue diferencial entre metabolitos. Mayor respuesta a la importación de carbohidratos se observó en los frutos de menor edad (1-8 semanas), lo cual pareciera lógico, ya que si bien está en la etapa inicial de la curva sigmoide de crecimiento (Salazar, 1993; Salazar *et al.*, 1994a, b) que se caracteriza por un crecimiento lento, este vertedero está importando compuestos que le permitan la división y elongación celular, a partir de compuestos como almidón, azúcares y síntesis de celulosa (figuras 7-14b, 7-14c y 7-15f). En las figuras 7-16B y 7-16C y 7-17F se reflejó este comportamiento a través de modelos espaciales. Si bien con el transcurso del tiempo los tres tipos de frutos acumularon almidón marcado en sus cloroplastos, fue más notorio para los $F1$, seguido de los $F2$ y $F3$ desde el inicio del experimento, similar a lo encontrado por Dentan (1985) en plantas de *Coffea arabica* L. y Catuaí Amarillo. Contrario a lo que se presentó en los azúcares totales, que desde el inicio del experimento los $F3$ ya mostraban valores de RI altos y estables en el tiempo, los $F1$

mostraron valores bajos al inicio, pero aumentaron ostensiblemente hasta el final, consiguiendo los más altos valores de *RI*, concordante con resultados en la misma especie, donde se sugiere que la actividad de la demanda fue alta en estados tempranos de desarrollo y disminuyó con la edad (Salazar, 1993; Salazar *et al.*, 1994a, b; Mosquera *et al.*, 1997). Franck *et al.* (2006) y Geromel *et al.* (2008) reportaron para *Coffea* sp. que la sacarosa es esencial para el control de las relaciones Fuente-Demanda y además es uno de los principales componentes de sus frutos. Las anteriores consideraciones deben presentar concordancia con lo descrito por Mosquera *et al.* (1997), quien sugiere que en diversos genotipos evaluados, la actividad fotosintética fue mayor en los primeros estados de desarrollo y disminuyó a medida que el fruto se acercó a la maduración (26 a 28 semanas de edad). Así mismo en todos los genotipos, los frutos jóvenes (10-16 semanas de edad) tuvieron mayores tasas de respiración oscura, proceso altamente relacionado con la mayor actividad de fuente y demanda.

Los lípidos juegan un papel fundamental en el metabolismo bioquímico. Gran parte de los lípidos sintetizados son utilizados por las células vegetales para hacer parte de su estructura, que en conjunto con las proteínas de membrana, le imparten a las células mayor o menor capacidad de flujo de iones y otros compuestos, tanto con las células adyacentes a través de los plasmodesmos (simplasma), como con los espacios intercelulares que hacen parte del apoplasta (Lambers *et al.*, 1998; Taiz y Zeiger, 2002). En el experimento se observó cómo, independiente del genotipo y del desarrollo de los frutos, en la medida que transcurrió el tiempo hubo mayores valores de *RI* para este compuesto, lo refleja su síntesis. De la misma manera mayores valores se presentaron en *F1*, seguidos de *F2* y *F3* respectivamente, que está de acuerdo con la edad, de tal forma que los frutos de mayor desarrollo no lo sintetizan en mayor medida, ya que su estructura y anatomía está definida, mientras los frutos de menor tamaño y desarrollo, como los *F2*, aún lo deben sintetizar para incrementar su tamaño. Igualmente, se observó mayor síntesis de lípidos en el material *CU1970* (figuras 7-15d y 7-17D) (anexo 7-14) que podría estar relacionado con una mayor producción.

El comportamiento descrito para los anteriores metabolitos se observó de igual manera para las proteínas, donde mayores valores al final del experimento se obtuvieron en los *F1*, aunque los *F2* y *F3* similarmente incrementaron los valores de *RI* en el tiempo, pero en menor escala (figura 7-17E). Lo anterior parece ser el reflejo de las necesidades de síntesis de proteínas de los frutos a lo largo de todo su desarrollo y crecimiento. Estas proteínas podrían estar relacionadas con la *PEP-C* y la *Rubisco*, las cuales en estudios previos han sido encontradas en los frutos, contribuyendo con su proceso fotosintético, tanto para *Coffea* sp. como para otras especies vegetales (Cannell, 1970; Beriashvili y Beriashvili, 1996; Angrand, 2002; Ocampo, 2003).

La dinámica observada en las hojas y en los frutos, básicamente en los primeros compuestos formados por *F*, como los almidones y los azúcares, se verá reflejada en la acumulación de materia seca. La figura 7-17F lo manifiesta, ya que la síntesis de celulosa se pudo observar en los frutos de menor desarrollo, seguida por los *F-2*, los cuales, y de acuerdo con la curva sigmoide de crecimiento, deben aún sintetizar este metabolito hasta alcanzar su máximo peso seco.

7.6 Conclusiones

- La metodología de marcación con $^{13}\text{CO}_2$ enriquecido es adecuada para el seguimiento de los principales compuestos del metabolismo vegetal en la etapa reproductiva de plantas de *Coffea arabica* L. var. Castillo® El Rosario.
- Hubo una clara respuesta de fuente y demanda entre hojas y frutos de acuerdo con la dinámica presentada en los metabolitos analizados.
- Los frutos de menor edad mostraron mayor potencial de demanda, pues se encuentran en estados tempranos de desarrollo y crecimiento, y sus exigencias de acumulación de compuestos provenientes de la fuente, así como los sintetizados por los mismos, son fundamentales para la acumulación de materia seca.
- En los frutos de mayor desarrollo se encontró la mayor cantidad de almidones, proteínas y celulosa, lo que coincidió con las menores cantidades de carbohidratos en las hojas, mostrando la dinámica Fuente-Demanda.
- La cantidad de azúcares totales no difirió entre tipos de frutos, lo cual muestra la importancia de este hidrato de carbono durante su crecimiento y desarrollo, así como su importancia en las relaciones fuente y demanda.
- Los mayores valores observados para el genotipo *CU1970* frente al *BH1409* en algunas variables de respuesta pueden estar relacionados con su mayor acumulación de materia seca y producción a lo largo de su ciclo productivo.

7.7 Bibliografía

Alvarado A., G.; Posada S., H.E.; Cortina G., H.A.; Duque O., H.; Baldión R., J.V.; Guzmán M., O. 2005. La Variedad Castillo El Rosario® para las regiones cafeteras de Antioquia, Risaralda y Caldas. Avances Técnicos Cenicafé (Colombia) No. 340:1-8.

Angrand, J.C. 2002. Floración, desarrollo vegetativo y fotosíntesis de *Coffea arabica* en diferentes sistemas de cultivos en Pérez Zeledón y Heredia, Costa Rica. Turrialba (Costa Rica), CATIE. 56 p.

Arcila P, J. 1987. Métodos prácticos para medición del área foliar del cafeto. Diseño de una reglilla para medición del área foliar en el campo. In: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé. Chinchiná (Colombia). Informe anual de labores de la Disciplina de Fisiología Vegetal. 1986-1987. Chinchiná, Cenicafé.

Beriashvili, T.V.; Beriashvili, L.T. 1996. Metabolism of malic and tartaric acids in grape berries. Biochemistry 61:1316-1321.

Blanke, M.M.; Lenz, F. 1989. Fruit Photosynthesis. Plant Cell. Environ. 12:31-46.

Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. 2000. Biochemistry molecular biology of plants. Rockville (Estados Unidos), American Society of Plant Physiologists. 1367 p.

Cannell, M.G.R. 1970. The contribution of carbohydrates from vegetative laterals to the growth of fruits on the bearing branches of *Coffea arabica* L. Kenya Coffee 35(417):323-327.

Cannell, M.G.R. 1971a. Effects of fruiting, defoliation and ring-barking on the accumulation and distribution of dry matter in branches of *C. arabica* L. in Kenya. Experimental Agriculture 7(1):63-74.

Cannell, M.G.R. 1971b. Production and distribution of dry matter in trees of *Coffea arabica* L. in Kenya as affected by seasonal climatic differences and the presence of fruits. Annals of Applied Biology 67(1):99-120.

Cunha, R.L. 2007. Crescimento, metabolismo do carbono e particao de assimilados em resposta a manipulacao da razao fonte:dreno em *Coffea arabica* L. sob condicoes de campo. Tese doutorado. Universidade Federal de Vicosa. 49 p.

Dentan, E. 1985. Etude microscopie du développement et de la maturation du grain de café. In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 11. Lomé (Togo), Février 11-15. Paris (Francia), ASIC. p. 381-398.

Edwards, D.; Jolliffe, P.; Ehret, D. 2010. Canopy profiles of starch and leaf mass per area in greenhouse tomato and the relationship with leaf area and fruit growth. Scientia Horticulturae 125:637-647. Consulta en: www.sciencedirect.com

Fedecafé. 2012. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe. Disciplina de Agroclimatología, Archivos Climáticos, Chinchiná, Caldas, Colombia.

Franck, N.; Vaast, P.; Génard, M.; Dauzat, J. 2006. Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea Arabica* L. Tree Physiology 26:517-525.

Geromel, C.; Ferreira, L.P.; Guerreiro, S.M.C.; Cavalari, A.A.; Pot, D.; Pereira, L.F.P.; Leroy, T.; Vieira, L.G.E.; Mazzafera, P.; Marraccini, P. 2006. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea Arabica* L.) fruit development. Journal of Experimental Botany 57(12):3243-3258.

Geromel, C.; Ferreira, L.P.; Davrieux, F.; Guyot, B.; Ribeyre, F.; dos Santos Scholz, M.B.; Pereira, L.F.P.; Vaast, P.; Pot, D.; Leroy, T.; Filho, A.A.; Vieira, L.G.E.; Mazzafera, P.; Marraccini, P. 2008. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits. Plant Physiology and Biochemistry 46:569-579. Consulta en: www.sciencedirect.com

Gómez G., L.F. 2004. Relación Fuente-Demanda en plantas completas de café *Coffea arabica* L. In: Centro Nacional de Investigaciones de Café Cenicafé. Chinchiná. Colombia. Informe anual de labores de la Disciplina de Fisiología Vegetal. Noviembre de 2003-Octubre de 2004.

González-Real, M.M.; Baille, A.; Liu, H.Q. 2008. Influence of fruit load on dry matter and N-distribution in sweet pepper plants. *Science Horticulturae* 117:307-315.

González-Real, M.M.; Liu, H.; Baille, A. 2009. Influence of fruit sink strength on the distribution of leaf photosynthetic traits in fruit-bearing shoots of pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Environmental and Experimental Botany* 66:195-202. Consulta en: www.sciencedirect.com

Holdridge, L.R. 1987. Ecología basada en zonas de vida. San José (Costa Rica), IICA. 216 p.

Lambers, H.; Chapin III, F.S.; Pons, T.L. 1998. *Plant Physiological Ecology*. New York (Estados Unidos), Springer. 540 p.

Laviola, B.G.; Martinez, H.E.P.; Salomao, L.C.Ch.; Cruz, C.D.; Mendonca, S.M.; Neto, A.P. 2007. Particao de fotoassimilados entre folhas e frutos de cafeeiro cultivado em duas altitudes. *Pesquisa agropecuaria brasileira* 42(11):1521-1530.

López, Y.; Riaño, N.; Mosquera, P.; Cadavid, A.; Arcila, J. 2000. Activities of phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1-5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves and fruit pericarp tissue of different coffee (*Coffea* sp.) genotypes. *Photosynthetica* 38(2):215-220.

Matsuda, R.; Suzuki, K.; Nakano, A.; Higashide, T.; Takaichi, M. 2011. Responses of leaf photosynthesis and plant growth to altered source-sink balance in a Japanese and a Dutch tomato cultivar. *Scientia Horticulturae* 127:520-527. Consulta en: www.sciencedirect.com

Miao, M.; Zhang, Z.; Xu, X.; Wang, K.; Cheng, H.; Cao, B. 2009. Different mechanisms to obtain higher fruit growth rate in two cold-tolerant cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines under low night temperature. *Scientia Horticulturae* 119. 357-361. Consulta en: www.sciencedirect.com

Morandi, B.; Manfrini, L.; Losciale, P.; Zibordi, M.; Corelli-Grappadelli, L. 2010. The positive effect of skin transpiration in peach fruit growth. *Journal of Plant Physiology* 167:1033-1037. Consulta en: www.sciencedirect.com

Morandi, B.; Zibordi, M.; Losciale, P.; Manfrini, L.; Pierpaoli, E.; Grappadelli, L.C. 2011. Shading decreases the growth rate of young apple fruit by reducing their phloem import. *Scientia Horticulturae* 127: 347-352. Consulta en: www.sciencedirect.com

Mosquera, S.; L.P.; Arcila, P.J.; Riaño, N.M. 1997. Determinación de la actividad fotosintética en frutos de café. In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos, 5. Santa Marta (Colombia), Mayo 28-30. Memorias. Bogotá (Colombia), Produmedios. p. 68-69.

Ocampo, D.M. 2003. Fotosíntesis y cambios en la composición del pericarpio durante el desarrollo del fruto del cafeto *Coffea arabica* cv Caturra. Manizales (Colombia), Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 62 p.

Park, S.J. 2011. Dry weight and carbohydrate distribution in different tree parts as affected by various fruit-loads of young persimmon and their effect on new growth in the next season. *Scientia Horticulturae* 130:732-736. Consulta en: www.sciencedirect.com

Reis, A.R. DOS; Alves, S.N.R.; Favarin, J.L.; Salgado, P.R.; Gaspari P., C. DE.; Camargo, F.T.DE. 2007. Remobilizacão de proteínas solúveis, clorofilas e amido pelas folhas e frutos de cafeeiro. In: SIMPOSIO de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 5. Aguas de Lindóia (Brasil), Maio 7-11. Anais. Brasília (Brasil), EMBRAPA Café. 4 p.

Salazar, M.R. 1993. Estudio anatómico y fisiológico del fruto del café *Coffea arabica* L. var. Colombia. Popayán (Colombia), Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, 98 p.

Salazar, M.R.; Chaves, B.; Riaño, N.M.; Arcila, J.; Jaramillo, A. 1994a. Crecimiento del fruto de café *Coffea arabica* var. Colombia. *Cenicafé* (Colombia) 45(2):41-50.

Salazar, M.R.; Riaño, N.M.; Arcila, J.; Ponce, C.A. 1994b. Estudio morfológico anatómico y ultraestructural del fruto de café *Coffea arabica* L. *Cenicafé* (Colombia) 45(3):93-105.

Sweetman, C.; Deluc, L.G.; Cramer, G.R.; Ford, Ch.M.; Soole, K.L. 2009. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* 70:1329-1344. Consulta en: www.sciencedirect.com

Zhang, C.; Tanabe, K. 2008. Partitioning of ¹³C-photosynthates from different current shoots neighboring with fruiting spur in later-maturing Japanese pear during the period of rapid fruit growth. *Scientia Horticulturae* 117:42-150.

7.A Anexos

Anexo 7-1

FOTOSÍNTESIS

Tabla ANOVA para Fotosíntesis [$\mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1.5376E11	4	3.84399E10	9.56	0.0000
Residuo	8.32082E11	207	4.01972E9		
Total (Corr.)	9.85842E11	211			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Genotipo	3.92695E10	1	3.92695E10	9.77	0.0020
Tratamiento	1.44531E10	1	1.44531E10	3.60	0.0503
Peso Seco	7.75101E10	1	7.75101E10	19.28	0.0000
Respiración	5.31559E10	1	5.31559E10	13.22	0.0003
Residuo	8.32082E11	207	4.01972E9		
Total (Corregido)	9.85842E11	211			

R-Cuadrada = 15.5968 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 13.9658 por ciento

Error estándar del Estadístico = 63401.3

Error medio absoluto = 51890.5

Estadístico Durbin-Watson = 0.738879 (P=0.0000)

RESPIRACIÓN

Tabla ANOVA para Respiración [$\mu\text{moles}_{(\text{CO}_2)}\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}$]

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	7.4158E8	4	1.85395E8	12.12	0.0000
Residuo	3.16595E9	207	1.52944E7		
Total (Corr.)	3.90753E9	211			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Genotipo	5.57515E8	1	5.57515E8	36.45	0.0000
Tratamiento	1.22844E7	1	1.22844E7	0.80	0.3712
Peso Seco	9.31862E7	1	9.31862E7	6.09	0.0144
Fotosíntesis	2.0225E8	1	2.0225E8	13.22	0.0003
Residuo	3.16595E9	207	1.52944E7		
Total (Corregido)	3.90753E9	211			

R-Cuadrada = 18.9782 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 17.4126 por ciento

Error estándar del Estadístico = 3910.81

Error medio absoluto = 3340.33

Estadístico Durbin-Watson = 0.735202 (P=0.0000)

Anexo 7-2

EFFECTO DE LAS VARIABLES EVALUADAS SOBRE LA RELACIÓN $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Número de Variables Dependientes: 1

Número de Factores Categóricos: 3

A = Metabolito
B = Genotipo
C = Tratamiento

Número de Factores Cuantitativos: 3

D = Asimilación de CO_2
E = Peso Seco
F = Respiración

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.00209218	10	0.000209218	19.96	0.0000
Residuo	0.00210711	201	0.0000104831		
Total (Corr.)	0.00419928	211			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Metabolito	0.00115293	5	0.000230585	22.00	0.0000
Genotipo	0.0000332383	1	0.0000332383	3.17	0.0765
Tratamiento	0.000701191	1	0.000701191	66.89	0.0000
Fotosíntesis	0.000105727	1	0.000105727	10.09	0.0017
Peso Seco	0.0000615813	1	0.0000615813	5.87	0.0162
Respiración	0.00000832774	1	0.00000832774	0.79	0.3738
Residuo	0.00210711	201	0.0000104831		
Total (corregido)	0.00419928	211			

R-Cuadrada = 49.8222 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 47.3258 por ciento

Error estándar del est. = 0.00323776

Error medio absoluto = 0.00193732

Estadístico Durbin-Watson = 1.34652 (P=0.0000)

Comparaciones Múltiples para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ por Tratamiento

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	107	0.0127644	0.000315237	B
Marcadas	105	0.0130838	0.00031836	A

Comparaciones Múltiples para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ por Metabolito

<i>Metabolito</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Proteínas	34	0.012031	0.000555662	D
Celulosa	34	0.0126572	0.000555677	D
Material Orgánico	36	0.014898	0.000539641	C
Lípidos	36	0.015216	0.000539641	CB
Almidón	36	0.0167207	0.000539641	B
Azúcares	36	0.0189517	0.000539641	A

Comparaciones Múltiples para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ por Genotipo

<i>Genotipo</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BH1409	106	0.0146453	0.000329905	A
CU1970	106	0.0155129	0.0003299	A

Anexo 7-3

ANAVA MATERIAL ORGÁNICO EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

FOTOSÍNTESIS (F)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Asimilación de CO₂

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Materia Orgánica"

Análisis de Varianza para Rln ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000665048	2	0.0000332524	11.39	0.0010
Residuo	0.0000438007	15	0.00000292005		
Total (Corr.)	0.000110306	17			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Asimilación de CO ₂	0.0000295005	1	0.0000295005	10.10	0.0062
Horas	0.00000799042	1	0.00000799042	2.74	0.1189
Residuo	0.0000438007	15	0.00000292005		
Total (corregido)	0.000110306	17			

R-Cuadrada = 60.2915 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 54.997 por ciento

Error estándar del est. = 0.00170881

Error medio absoluto = 0.00119855

Estadístico Durbin-Watson = 1.61287 (P=0.1018)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación ¹³CO₂/¹²CO₂ MO = 0.00955921 + 4.99736E-8*Asimilación de CO₂ + 0.0000607867*Horas

RESPIRACIÓN (R)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Respiración

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Materia Orgánica"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000380219	2	0.000019011	3.95	0.0420
Residuo	0.0000722836	15	0.00000481891		
Total (Corr.)	0.000110306	17			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Respiración	0.00000101759	1	0.00000101759	0.21	0.6524
Horas	0.0000372201	1	0.0000372201	7.72	0.0140
Residuo	0.0000722836	15	0.00000481891		
Total (corregido)	0.000110306	17			

R-Cuadrada = 34.4696 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 25.7322 por ciento

Error estándar del est. = 0.0021952

Error medio absoluto = 0.00152753

Estadístico Durbin-Watson = 1.06974 (P=0.0047)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ MO = 0.0181299 - 4.56108E-8*Respiración - 0.0000480478*Horas

Anexo 7-4

ANAVA ALMIDÓN EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

FOTOSÍNTESIS (F)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Asimilación de CO₂

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Almidón"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.000734913	4	0.000183728	4.49	0.0170
Residuo	0.000532288	13	0.0000409452		
Total (Corr.)	0.0012672	17			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Asimilación de CO ₂	0.000409916	1	0.000409916	10.01	0.0075
Horas	0.000123958	1	0.000123958	3.03	0.1055
Asimilación de CO ₂ *Horas	0.0000806936	1	0.0000806936	1.97	0.1838
Horas*Horas	0.0000738957	1	0.0000738957	1.80	0.2021
Residuo	0.000532288	13	0.0000409452		
Total (corregido)	0.0012672	17			

R-Cuadrada = 57.995 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 45.0704 por ciento

Error estándar del est. = 0.00639885

Error medio absoluto = 0.00313291

Estadístico Durbin-Watson = 1.92557 (P=0.1123)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación ¹³CO₂/¹²CO₂ Almidón= **-0.0137385 + 2.05169E-7*Asimilación de CO₂ + 0.00112028*Horas - 5.40844E-9*Asimilación de CO₂*Horas - 0.00000831367*Horas²**

RESPIRACIÓN (R)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A=Respiración

B=Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Almidón"

Análisis de Varianza para Rln 13CO₂\12CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.000671878	4	0.000167969	3.67	0.0328
Residuo	0.000595323	13	0.0000457941		
Total (Corr.)	0.0012672	17			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Respiración	0.000349544	1	0.000349544	7.63	0.0161
Horas	5.65394E-8	1	5.65394E-8	0.00	0.9725
Respiración*Horas	0.000187929	1	0.000187929	4.10	0.0638
Horas*Horas	0.000078884	1	0.000078884	1.72	0.2121
Residuo	0.000595323	13	0.0000457941		
Total (corregido)	0.0012672	17			

R-Cuadrada = 53.0206 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 38.5655 por ciento

Error estándar del est. = 0.00676713

Error medio absoluto = 0.00378859

Estadístico Durbin-Watson = 1.64709 (P=0.0259)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Almidón} = -0.00978913 - 0.00000221012 * \text{Respiración} - 0.0000158791 * \text{Horas} + 3.33187\text{E-}8 * \text{Respiración} * \text{Horas} + 0.00000584028 * \text{Horas}^2$$

Anexo 7-5

ANAVA AZÚCARES TOTALES EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

FOTOSÍNTESIS (F)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Asimilación de CO₂

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Azúcares"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.000278721	2	0.000139361	12.62	0.0006
Residuo	0.000165674	15	0.0000110449		
Total (Corr.)	0.000444395	17			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Asimilación de CO ₂	0.0000719003	1	0.0000719003	6.51	0.0221
Horas	0.00000688774	1	0.00000688774	0.62	0.4420
Residuo	0.000165674	15	0.0000110449		
Total (corregido)	0.000444395	17			

R-Cuadrada = 62.7193 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 57.7485 por ciento

Error estándar del est. = 0.00332339

Error medio absoluto = 0.00243744

Estadístico Durbin-Watson = 1.66264 (P=0.1232)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación ¹³CO₂/¹²CO₂ Azúcares = 0.013068 + 7.80174E-8*Asimilación de CO₂ + 0.0000564367*Horas

RESPIRACIÓN (R)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Respiración

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Azúcares"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.000213522	2	0.000106761	6.94	0.0074
Residuo	0.000230873	15	0.0000153916		
Total (Corr.)	0.000444395	17			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Respiración	0.00000670063	1	0.00000670063	0.44	0.5194
Horas	0.000208137	1	0.000208137	13.52	0.0022
Residuo	0.000230873	15	0.0000153916		
Total (corregido)	0.000444395	17			

R-Cuadrada = 48.0477 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 41.1208 por ciento

Error estándar del est. = 0.00392321

Error medio absoluto = 0.00286755

Estadístico Durbin-Watson = 1.2399 (P=0.0155)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ Azúcares = 0.0256352 - 1.17041E-7*Respiración - 0.000113621*Horas

Anexo 7-6

ANAVA LÍPIDOS TOTALES EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

FOTOSÍNTESIS (F)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Asimilación de CO₂

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Lípidos"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00000432788	2	0.00000216394	2.09	0.1588
Residuo	0.0000155628	15	0.00000103752		
Total (Corr.)	0.0000198907	17			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Asimilación de CO ₂	0.00000124211	1	0.00000124211	1.20	0.2911
Horas	0.0000028235	1	0.0000028235	2.72	0.1198
Residuo	0.0000155628	15	0.00000103752		
Total (corregido)	0.0000198907	17			

R-Cuadrada = 21.7583 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 11.3261 por ciento

Error estándar del est. = 0.00101859

Error medio absoluto = 0.00071487

Estadístico Durbin-Watson = 1.77551 (P=0.1822)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación ¹³CO₂/¹²CO₂ Lípidos = 0.0132533 + 1.02543E-8*Asimilación de CO₂ + 0.0000361341*Horas

RESPIRACIÓN (R)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Respiración

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Lípidos"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00000765622	2	0.00000382811	4.69	0.0261
Residuo	0.0000122345	15	8.15631E-7		
Total (Corr.)	0.0000198907	17			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Respiración	0.00000457045	1	0.00000457045	5.60	0.0318
Horas	0.00000294659	1	0.00000294659	3.61	0.0767
Residuo	0.0000122345	15	8.15631E-7		
Total (corregido)	0.0000198907	17			

R-Cuadrada = 38.4915 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 30.2903 por ciento

Error estándar del est. = 0.000903123

Error medio absoluto = 0.00064184

Estadístico Durbin-Watson = 1.5062 (P=0.0641)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ Lípidos= 0.013463 - 9.66628E-8*Respiración + 0.000013519*Horas

Anexo 7-7

ANAVA PROTEÍNAS TOTALES EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

FOTOSÍNTESIS (F)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Asimilación de CO₂

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Proteínas"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4.30895E-8	2	2.15448E-8	2.25	0.1418
Residuo	1.33878E-7	14	9.56268E-9		
Total (Corr.)	1.76967E-7	16			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Asimilación de CO ₂	4.27242E-9	1	4.27242E-9	0.45	0.5147
Horas	1.77384E-8	1	1.77384E-8	1.85	0.1947
Residuo	1.33878E-7	14	9.56268E-9		
Total (corregido)	1.76967E-7	16			

R-Cuadrada = 24.3489 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 13.5416 por ciento

Error estándar del est. = 0.000097789

Error medio absoluto = 0.0000735394

Estadístico Durbin-Watson = 2.12172 (P=0.4369)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación ¹³CO₂/¹²CO₂ Proteínas = 0.011926 + 6.09645E-10*Asimilación de CO₂ + 0.00000295519*Horas

RESPIRACIÓN (R)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Respiración

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Proteínas"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3.88173E-8	2	1.94087E-8	1.97	0.1767
Residuo	1.3815E-7	14	9.86784E-9		
Total (Corr.)	1.76967E-7	16			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Respiración	2.41314E-13	1	2.41314E-13	0.00	0.9961
Horas	3.83738E-8	1	3.83738E-8	3.89	0.0687
Residuo	1.3815E-7	14	9.86784E-9		
Total (corregido)	1.76967E-7	16			

R-Cuadrada = 21.9348 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 10.7826 por ciento

Error estándar del est. = 0.000099337

Error medio absoluto = 0.0000725706

Estadístico Durbin-Watson = 2.03061 (P=0.3592)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ Proteínas = 0.0120403 + 0.0*Respiración + 0.0000016059*Horas

Anexo 7-8

ANAVA CELULOSA EN HOJAS DE PLANTAS MARCADAS

FOTOSÍNTESIS (F)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Asimilación de CO₂

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Celulosa"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.55392E-7	2	7.76962E-8	0.60	0.5659
Residuo	0.00000169752	13	1.30579E-7		
Total (Corr.)	0.00000185291	15			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Asimilación de CO ₂	3.5465E-8	1	3.5465E-8	0.27	0.6110
Horas	9.0838E-8	1	9.0838E-8	0.70	0.4193
Residuo	0.00000169752	13	1.30579E-7		
Total (corregido)	0.00000185291	15			

R-Cuadrada = 8.38638 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 0.0 por ciento

Error estándar del est. = 0.000361357

Error medio absoluto = 0.000278132

Estadístico Durbin-Watson = 1.58558 (P=0.0920)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación ¹³CO₂/¹²CO₂ Celulosa = 0.0123899 + 1.76489E-9*Asimilación de CO₂ + 0.00000655346*Horas

RESPIRACIÓN (R)

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 0

Número de factores cuantitativos: 2

A = Respiración

B = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Celulosa"

Análisis de Varianza para Relación ¹³CO₂/¹²CO₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.24555E-7	2	6.22776E-8	0.47	0.6362
Residuo	0.00000172836	13	1.32951E-7		
Total (Corr.)	0.00000185291	15			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Respiración	4.62784E-9	1	4.62784E-9	0.03	0.8549
Horas	1.20681E-7	1	1.20681E-7	0.91	0.3581
Residuo	0.00000172836	13	1.32951E-7		
Total (corregido)	0.00000185291	15			

R-Cuadrada = 6.72213 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 0.0 por ciento

Error estándar del est. = 0.000364624

Error medio absoluto = 0.000279403

Estadístico Durbin-Watson = 1.59401 (P=0.0996)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ Celulosa = 0.0126632 - 3.44782E-9*Respiración + 0.00000274813*Horas

Anexo 7-9

ANAVA MATERIA ORGÁNICA EN RAMAS DE PLANTAS MARCADAS

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 1

A = Genotipo

Número de factores cuantitativos: 2

B = $R \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)} \text{m}^{-2} \text{día}^{-1}$

C = Horas

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	7.10075E-7	3	2.36692E-7	7.29	0.0035
Residuo	4.54369E-7	14	3.24549E-8		
Total (Corr.)	0.00000116444	17			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
gen	7.14981E-8	1	7.14981E-8	2.20	0.1599
$R \mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)} \text{m}^{-2} \text{día}^{-1}$	2.483E-7	1	2.483E-7	7.65	0.0152
Horas	4.6791E-7	1	4.6791E-7	14.42	0.0020
Residuo	4.54369E-7	14	3.24549E-8		
Total (corregido)	0.00000116444	17			

R-Cuadrada = 60.9798 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 52.6183 por ciento

Error estándar del est. = 0.000180152

Error medio absoluto = 0.000121315

Estadístico Durbin-Watson = 2.83755 (P=0.8979)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ MO} = 0.0134358 - 0.0000868991 * \text{I1}(1) + 3.10651\text{E-}8 * R \mu\text{mol m}^{-2} \text{día}^{-1} + 0.00000538808 * \text{Horas}$$

en donde:

I1(1) = 1 si gen=BH1409, -1 si gen=CU1970, 0 de lo contrario.

Anexo 7-10

ANAVA GENERAL INFLUENCIA DE LOS FACTORES EN LA RI PARA LOS FRUTOS

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 3

A = Genotipo

B = Metabolito

C = Tratamiento

Número de factores cuantitativos: 3

D = Tiempo

E = Gramos de peso seco

F = Respiración

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00202812	10	0.000202812	203.72	0.0000
Residuo	0.000592361	595	9.95564E-7		
Total (Corr.)	0.00262048	605			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Genotipo	0.00000271584	1	0.00000271584	2.73	0.0991
Metabolito	0.00179015	5	0.00035803	359.63	0.0000
Tratamiento	0.000193363	1	0.000193363	194.22	0.0000
Tiempo	0.0000518594	1	0.0000518594	52.09	0.0000
Gramos de peso seco	0.00000815325	1	0.00000815325	8.19	0.0044
Respiración	0.0000111311	1	0.0000111311	11.18	0.0009
Residuo	0.000592361	595	9.95564E-7		
Total (corregido)	0.00262048	605			

R-Cuadrada = 77.395 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 77.0151 por ciento

Error estándar del est. = 0.000997779

Error medio absoluto = 0.000695338

Estadístico Durbin-Watson = 1.35062 (P=0.0000)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 = 0.0146454 - 0.0000746166 \cdot \text{I1}(1) + 0.00254912 \cdot \text{I2}(1) + 0.00182655 \cdot \text{I2}(2) - 0.00148963 \cdot \text{I2}(3) + 0.000356346 \cdot \text{I2}(4) - 0.00114653 \cdot \text{I2}(5) + 0.000569148 \cdot \text{I3}(1) + 0.0000097175 \cdot \text{Tiempo} - 0.000038319 \cdot \text{Gramos de peso seco} + 3.42856 \cdot \text{Respiración}$$

en donde:

I1(1) = 1 si Genotipo = BH1409, -1 si Genotipo = CU1970, 0 de lo contrario

I2(1) = 1 si Metabolito = Almidón, -1 si Metabolito = Proteínas, 0 de lo contrario

I2(2) = 1 si Metabolito = Azúcares, -1 si Metabolito = Proteínas, 0 de lo contrario

I2(3) = 1 si Metabolito = Celulosa, -1 si Metabolito = Proteínas, 0 de lo contrario

I2(4) = 1 si Metabolito = Lípidos, -1 si Metabolito = Proteínas, 0 de lo contrario

I2(5) = 1 si Metabolito = Materia Orgánica, -1 si Metabolito = Proteínas, 0 de lo contrario

I3(1) = 1 si Tratamiento = Marcadas, -1 si Tratamiento = Control, 0 de lo contrario

Método: 95.0 porciento Duncan

<i>Genotipo</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BH1409	298	0.0142705	0.0000613322	A
CU1970	308	0.0144198	0.0000601104	A

Método: 95.0 porciento Duncan

<i>Metabolito</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Proteínas	96	0.0122493	0.000102006	F
Celulosa	104	0.0128555	0.0000978621	E
Materia Orgánica	97	0.0131986	0.00010139	D
Lípidos	104	0.0147015	0.0000978671	C
Azúcares	105	0.0161717	0.0000974005	B
Almidón	100	0.0168943	0.0000999215	A

Método: 95.0 porciento Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	296	0.013776	0.0000582819	B
Marcadas	310	0.0149143	0.0000568489	A

Anexo 7-11

ANAVA MATERIA ORGÁNICA EN FRUTOS DE PLANTAS MARCADAS

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 1

A = Genotipo

Número de factores cuantitativos: 2

B = Gramos de peso seco

C = Tiempo

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Materia Orgánica"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000471129	4	0.0000117782	21.67	0.0000
Residuo	0.0000222839	41	5.4351E-7		
Total (Corr.)	0.0000693968	45			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Genotipo	0.00000207666	1	0.00000207666	3.82	0.0575
Gramos de peso seco*Gramos de peso seco	5.19863E-7	1	5.19863E-7	0.96	0.3338
Tiempo*Tiempo	0.0000376533	1	0.0000376533	69.28	0.0000
Gramos de peso seco*Tiempo*Tiempo	0.0000056747	1	0.0000056747	10.44	0.0024
Residuo	0.0000222839	41	5.4351E-7		
Total (corregido)	0.0000693968	45			

R-Cuadrada = 67.8892 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 64.7564 por ciento

Error estándar del est. = 0.000737231

Error medio absoluto = 0.000526766

Estadístico Durbin-Watson = 2.00416 (P=0.3617)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ MO} = 0.0125942 + 0.000213395 * \text{I1}(1) + 0.00000364919 * \text{Gramos de peso seco}^2 + 5.8554\text{E-}7 * \text{Tiempo}^2 - 4.64241\text{E-}8 * \text{Gramos de peso seco} * \text{Tiempo}^2$$

en donde:

I1(1) = 1 si Genotipo=BH1409, -1 si Genotipo=CU1970, 0 de lo contrario.

Anexo 7-12

ANAVA ALMIDÓN EN FRUTOS DE PLANTAS MARCADAS

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 1

A = Genotipo

Número de factores cuantitativos: 2

B = Gramos de peso seco

C = Tiempo

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Almidón"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000175091	3	0.00000583636	3.52	0.0223
Residuo	0.0000745379	45	0.0000016564		
Total (Corr.)	0.000092047	48			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Genotipo	1.11897E-7	1	1.11897E-7	0.07	0.7961
Gramos de peso seco	0.00000645023	1	0.00000645023	3.89	0.0546
Tiempo	0.0000116719	1	0.0000116719	7.05	0.0109
Residuo	0.0000745379	45	0.0000016564		
Total (corregido)	0.000092047	48			

R-Cuadrada = 19.0219 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 13.6233 por ciento

Error estándar del est. = 0.00128701

Error medio absoluto = 0.000867372

Estadístico Durbin-Watson = 1.5999 (P=0.0409)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Almidón} = 0.0171113 + 0.0000479861 * \text{I1(1)} - 0.000101892 * \text{Gramos de peso seco} + 0.0000163814 * \text{Tiempo}$$

en donde:

I1(1) = 1 si Genotipo = BH1409, -1 si Genotipo = CU1970, 0 de lo contrario.

Anexo 7-13

ANAVA AZÚCARES TOTALES EN FRUTOS DE PLANTAS MARCADAS

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 1

A = Genotipo

Número de factores cuantitativos: 2

B = Gramos de peso seco

C = Tiempo

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Azúcares"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000669581	4	0.0000167395	6.10	0.0005
Residuo	0.000134477	49	0.00000274443		
Total (Corr.)	0.000201435	53			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Genotipo	0.00000290717	1	0.00000290717	1.06	0.3084
Gramos de peso seco*Gramos de peso seco	0.00000456272	1	0.00000456272	1.66	0.2033
Tiempo*Tiempo	0.0000527324	1	0.0000527324	19.21	0.0001
Gramos de peso seco*Tiempo*Tiempo	0.00000427111	1	0.00000427111	1.56	0.2181
Residuo	0.000134477	49	0.00000274443		
Total (corregido)	0.000201435	53			

R-Cuadrada = 33.2405 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 27.7908 por ciento

Error estándar del est. = 0.00165663

Error medio absoluto = 0.0011702

Estadístico Durbin-Watson = 2.17775 (P=0.6270)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Azúcares} = 0.0158955 + 0.000233361 \cdot \text{II}(1) + 0.00000908234 \cdot \text{Gramos de peso seco}^2 + 5.95942\text{E-}7 \cdot \text{T tiempo}^2 - 3.73056\text{E-}8 \cdot \text{Gramos de peso seco} \cdot \text{T tiempo}^2$$

en donde:

II(1) = 1 si Genotipo = BH1409, -1 si Genotipo = CU1970, 0 de lo contrario.

Anexo 7-14

ANAVA LÍPIDOS TOTALES EN FRUTOS DE PLANTAS MARCADAS

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 1

A = Genotipo

Número de factores cuantitativos: 2

B = Gramos de peso seco

C = Tiempo

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Lípidos"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000297622	4	0.00000744055	9.88	0.0000
Residuo	0.0000369054	49	7.53172E-7		
Total (Corr.)	0.0000666676	53			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Genotipo	0.0000142318	1	0.0000142318	18.90	0.0001
Gramos de peso seco*Gramos de peso seco	3.67887E-10	1	3.67887E-10	0.00	0.9825
Tiempo*Tiempo	0.0000108046	1	0.0000108046	14.35	0.0004
Gramos de peso seco*Tiempo*Tiempo	2.93292E-7	1	2.93292E-7	0.39	0.5355
Residuo	0.0000369054	49	7.53172E-7		
Total (corregido)	0.0000666676	53			

R-Cuadrada = 44.6427 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 40.1237 por ciento

Error estándar del est. = 0.000867855

Error medio absoluto = 0.000596616

Estadístico Durbin-Watson = 1.19226 (P=0.0003)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Lípidos} = 0.0143813 - 0.000516323 * \text{I1}(1) + 8.15536\text{E-}8 * \text{Gramos de peso seco}^2 + 2.69756\text{E-}7 * \text{Tiempo}^2 - 9.77582\text{E-}9 * \text{Gramos de peso seco} * \text{Tiempo}^2$$

en donde:

I1(1) = 1 si Genotipo = BH1409, -1 si Genotipo = CU1970, 0 de lo contrario.

Anexo 7-15

ANAVA PROTEÍNAS TOTALES EN FRUTOS DE PLANTAS MARCADAS

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 1

A = Genotipo

Número de factores cuantitativos: 2

B = Gramos de peso seco

C = Tiempo

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Proteínas"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00000133587	4	3.33967E-7	2.12	0.0929
Residuo	0.00000773402	49	1.57837E-7		
Total (Corr.)	0.00000906989	53			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Genotipo	9.49845E-7	1	9.49845E-7	6.02	0.0178
Gramos de peso seco*Gramos de peso seco	1.27603E-8	1	1.27603E-8	0.08	0.7774
Tiempo*Tiempo	1.89524E-7	1	1.89524E-7	1.20	0.2785
Gramos de peso seco*Tiempo*Tiempo	3.46555E-10	1	3.46555E-10	0.00	0.9628
Residuo	0.00000773402	49	1.57837E-7		
Total (corregido)	0.00000906989	53			

R-Cuadrada = 14.7286 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 7.76765 por ciento

Error estándar del est. = 0.000397287

Error medio absoluto = 0.000267764

Estadístico Durbin-Watson = 1.65795 (P=0.0535)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Proteínas} = 0.0123481 - 0.000133389 * \text{I1}(1) - 4.80305\text{E-}7 * \text{Gramos de peso seco}^2 + 3.57271\text{E-}8 * \text{Tiempo}^2 - 3.36039\text{E-}10 * \text{Gramos de peso seco} * \text{Tiempo}^2$$

en donde:

I1(1) = 1 si Genotipo = BH1409, -1 si Genotipo = CU1970, 0 de lo contrario.

Anexo 7-16

ANAVA CELULOSA EN FRUTOS DE PLANTAS MARCADAS

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 1

A = Genotipo

Número de factores cuantitativos: 2

B = Gramos de peso seco

C = Tiempo

Selección de la Variable: Tratamiento = "Marcadas"; Metabolito = "Celulosa"

Análisis de Varianza para Relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000373669	4	0.00000934172	10.57	0.0000
Residuo	0.0000424078	48	8.83497E-7		
Total (Corr.)	0.0000797747	52			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Genotipo	0.0000010046	1	0.0000010046	1.14	0.2916
Gramos de peso seco*Gramos de peso seco	3.81114E-7	1	3.81114E-7	0.43	0.5145
Tiempo*Tiempo	0.0000296423	1	0.0000296423	33.55	0.0000
Gramos de peso seco*Tiempo*Tiempo	0.00000273633	1	0.00000273633	3.10	0.0848
Residuo	0.0000424078	48	8.83497E-7		
Total (corregido)	0.0000797747	52			

R-Cuadrada = 46.8405 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 42.4106 por ciento

Error estándar del est. = 0.000939945

Error medio absoluto = 0.000602446

Estadístico Durbin-Watson = 1.79929 (P=0.1416)

El StatAdvisor

Esta tabla muestra intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes en el modelo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2 \text{ Celulosa} = 0.012342 + 0.000142045 * I(1) + 0.00000375175 * \text{Gramos de peso seco}^2 + 4.65596\text{E-}7 * \text{Tiempo}^2 - 3.80916\text{E-}8 * \text{Gramos de peso seco} * \text{Tiempo}^2$$

en donde:

$I(1) = 1$ si Genotipo = BH1409, -1 si Genotipo = CU1970, 0 de lo contrario.

8. Discusión general

El seguimiento y trazabilidad de los principales compuestos sintetizados al interior del aparato fotosintético vegetal permite generar información que propenda por incrementar la productividad de los cultivos. Es un tópico de relevante importancia, y dada la complejidad en su estudio, se recurrió a la realización de diversos experimentos, tanto en laboratorio como en campo, que abarcaron los diferentes estados de desarrollo, y que particularmente en especies de ciclo largo como el café, la superposición de eventos es una constante, donde la ocurrencia de crecimiento vegetativo y reproductivo es simultánea.

La utilización del isótopo no radiactivo del carbono (^{13}C) a partir del enriquecimiento del aire ambiental, el cual pasó de una composición de 1.1% a 72% de $^{13}\text{CO}_2$, permitió trazar y seguir el movimiento de los principales productos del metabolismo bioquímico y fotosintético, de acuerdo con la etapa de desarrollo de plantas de *Coffea arabica* L. cv. Castillo® El Rosario. A diferencia de la mayoría de trabajos donde han experimentado con ^{13}C empobrecido, ésta metodología se hizo con ^{13}C enriquecido, con resultados satisfactorios y prometedores para posteriores investigaciones.

Las variables climáticas durante los experimentos posibilitaron que las tasas de intercambio gaseoso foliar, tanto fotosíntesis como respiración, tuvieran un comportamiento de acuerdo con la edad y el tratamiento respectivo, y permitieron seguir la dinámica metabólica entre los órganos fuente y demanda. A lo largo del trabajo se observó la respuesta del material vegetal a la oferta climática, donde días de $T^\circ\text{C}$ y RFA moderados y bajo DPV , correspondieron a mayores tasas fotosintéticas, en tanto días bajo condiciones contrarias respondieron a menores valores de fotosíntesis, tal como ha sido reportado en diversos trabajos para ésta misma especie, así como en otras especies con metabolismo fotosintético C_3 .

Para hacer productivo y eficiente un cultivo es necesario conocer en buena parte su metabolismo, si no todo, y como funcionan tanto los órganos fuente como demanda de carbohidratos. Es así como en *L. esculentum* L. se ha identificado, por ejemplo, cuales hojas son más eficientes y responsables por el óptimo crecimiento y desarrollo de los frutos presentes, y como prácticas como el raleo posibilitan la obtención de cosechas más abundantes, homogéneas y de mejor calidad. Encontrar el momento en el cual una hoja de *C. arabica* L. deja de ser importadora para ser exportadora neta de asimilados fotosintéticos no es fácil. Diversos estudios en otras especies muestran que las hojas presentan un comportamiento basipétalo para el proceso Fuente-Demanda, de tal manera que mientras su parte distal se comporta como fuente, su parte basal es aún demanda, lo que ha sido soportado por estudios anatómicos, donde las nervaduras

secundarias y terciarias, así como la comunicación por el simplasto, a través de los plasmodesmos, lo han revelado.

En el presente trabajo, y de acuerdo con la metodología utilizada, no se logró establecer tal límite, ya que las hojas de los nudos 1 al 6 mostraron parte del $^{13}\text{CO}_2$ que ingresó por fotosíntesis a partir de la marcación de las hojas del nudo 3, las cuales son altamente funcionales, demostrado en sus elevadas tasas fotosintéticas y respiratorias. Esto quiere decir que aún las hojas de mayor edad, que presentaron las más bajas tasas de asimilación de CO_2 , como las del nudo 6 (120-150 días de emergencia) aún requieren de fotosintatos de las hojas más funcionales, fundamentalmente para su mantenimiento. De igual forma, las hojas del nudo 1, que contaban con 20-30 días de edad, requirieron del CO_2 que ingresó por fotosíntesis así como del $^{13}\text{CO}_2$ proveniente del nudo 3, por lo tanto, y como es de esperar, son hojas altamente dependientes de los carbohidratos exportados desde las hojas adyacentes, así como de los almacenados en la misma rama y en las vecinas. Si se tiene en cuenta que la duración de una hoja de café adherida a la rama, bajo condiciones normales, es de 12-15 meses, y que además una rama puede albergar hasta 25-30 nudos, no sorprende que una hoja de 4-5 meses de edad aún se comporte como vertedero.

La temperatura juega un papel crucial en el metabolismo vegetal. Valores inferiores o superiores al óptimo, para diversos procesos fisiológicos, traen como consecuencia la disminución o pérdida del potencial productivo. En términos del proceso de intercambio gaseoso y de la relación Fuente-Demanda de asimilados en café ha sido ampliamente documentado que temperaturas alrededor de 25°C - 27°C son óptimas. Los resultados obtenidos y evaluados a 25°C corroboraron la anterior consideración, al obtener una fotosíntesis neta positiva, contrario a cuando se evaluaron temperaturas de 15°C y 35°C , que resultaron negativas. Los estudios mencionados, donde se ha evaluado el intercambio de gases y han definido tal temperatura óptima, no han tenido en cuenta el proceso de respiración oscura, proceso este igual de fundamental en el metabolismo vegetal, por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto la necesidad de profundizar en el proceso respiratorio, para comprender de mejor manera la fisiología del cultivo y así contribuir a mejorar aún más su productividad.

Las altas exigencias energéticas a los 35°C , que generaron un metabolismo enzimático más activo, causaron altas tasas respiratorias y muy bajas fotosintéticas, que incidieron en el movimiento de los carbohidratos marcados entre órganos. Además, el aumento en R es causado por otros factores diferentes al normal incremento en la cinética enzimática, como la mayor demanda de ATP para el mantenimiento celular por mayor acumulación de biomasa. Igualmente se afecta la interacción entre las reacciones involucradas en el metabolismo del carbono y el transporte de sustancias; esto, en conjunto con los procesos fotoquímicos en las membranas fotosintéticas, causan una rápida disminución de la fotosíntesis, mientras a bajas $T^\circ\text{C}$ el factor limitante es la actividad de *Rubisco*, la cual presenta alta dependencia de las condiciones térmicas exógenas.

Si bien se obtuvo una fotosíntesis neta negativa a los 15°C , los valores de fotosíntesis máxima fueron los más altos, lo cual soporta los resultados de diversos trabajos donde se encontró que temperaturas similares en campo generaron elevadas tasas de asimilación de CO_2 en café. Sin embargo, en tales trabajos no se tuvo en cuenta el

proceso respiratorio, que como se mencionó, contribuyó al balance de producción de biomasa.

El proceso de fuente y demanda se reflejó claramente en los metabolitos estudiados, de tal manera que en las hojas, y principalmente para el *MO*, los almidones y los azúcares totales se observó que la *RI* disminuyó con el tiempo, lo que se evidenció en la exportación de compuestos hacia tallos y raíces. Los azúcares totales, bajo las tres temperaturas, mostraron valores de *RI* decrecientes en el tiempo y similar al *MO*, lo que demuestra que, independiente de la $T^{\circ}\text{C}$, el metabolismo vegetal está regulado por los azúcares sintetizados en la fase oscura del ciclo fotosintético, en particular sacarosa, glucosa y fructosa. El comportamiento diferencial de los almidones de acuerdo con la temperatura evaluada, demostró menores necesidades energéticas a los 15°C causando su acumulación en los cloroplastos, mientras a los 35°C por efecto de un metabolismo más dinámico, las hexosas y triosas fosfato son dirigidas hacia la síntesis de azúcares, para rápidamente ser enviados a los tejidos de demanda, en tanto a los 25°C su comportamiento fue regulado, de tal manera que hubo degradación de almidón, tanto de reserva como del recientemente sintetizado, compostamiento que ha sido reportado en otras especies perennes, como los forestales.

Igualmente, la detección de celulosa marcada en el tiempo reflejó la formación de componentes de pared celular, asociados con la expansión celular y el crecimiento. Hubo más marcación de lípidos que de celulosa y proteínas, y a su vez mayor a los 35°C , lo que indicó mayor síntesis del compuesto por efecto de mayores exigencias energéticas a elevadas temperaturas, así como el mantenimiento de la homeostasis del sistema, con el fin de mantener las paredes celulares bajo condiciones fisiológicas adecuadas de resistencia, flexibilidad y fluidez.

El incremento continuo de azúcares totales y almidón en el tallo a los 25°C , corrobora la hipótesis de ser la temperatura óptima para un normal desempeño fisiológico, que permite un eficiente y regulado proceso, tanto de importación de asimilados para su propio crecimiento, como de órgano de soporte para el transporte de sustancias, fundamentalmente azúcares, hacia las raíces, las cuales a su vez mostraron comportamiento típico de órgano vertedero y de almacenamiento energético, pues la mayor detección de azúcares totales marcados y posterior síntesis y acumulación de almidón, luego de 24 horas de marcación con $^{13}\text{CO}_2$, así lo evidenció.

Cuando se evaluó la relación Fuente-Demanda en la etapa reproductiva, se encontró igualmente una clara exportación de compuestos marcados provenientes de las hojas hacia los frutos vertederos. La cuantificación de los principales metabolitos sintetizados mostró una dinámica lógica de acuerdo con el estado de desarrollo y crecimiento de los frutos. Cada una de las etapas de crecimiento y desarrollo evaluadas se caracteriza por una estructura interna y externa diferencial, de tal forma que la respuesta fisiológica a las condiciones ambientales hace que su metabolismo no sea el mismo. De igual manera, la dinámica entre fuente y demanda de asimilados con base en el desarrollo de los frutos, ejerce alta influencia en los procesos de fotosíntesis y respiración, así como en la transpiración, lo que implica diferencias en la fuerza de los frutos para atraer savia elaborada.

Los frutos de mayor desarrollo (*F3*) presentaron las mayores proporciones de almidones, proteínas y celulosa, seguidos por los *F2* y *F1*, siendo normal debido a su estado de desarrollo. Los azúcares totales no presentaron diferencias en concentración entre los tres tipos de frutos, lo que da sustento a la importancia de estos metabolitos en todas las etapas de su crecimiento, y más aún, en el balance general de producción total de la planta.

En la literatura no se encontraron reportes para *Coffea* sp. en los que se haya evaluado la dinámica de los lípidos a través del desarrollo del fruto con todas sus estructuras como un todo. Por lo tanto la información obtenida en este experimento es interesante para entender en términos fisiológicos, con experimentos posteriores, tal dinámica a través del desarrollo del fruto y su influencia en la bebida final.

De acuerdo con la edad del vertedero, la respuesta fue diferencial entre metabolitos marcados. Mayores valores de importación de carbohidratos se observaron en los frutos más jóvenes (1-8 semanas), lo que parece lógico, ya que si bien se encontraban en la etapa inicial de la curva sigmoide de crecimiento, que se caracteriza por ser lento, este vertedero está importando compuestos que le permitan su división y elongación celular, a partir de metabolitos como almidón, azúcares y síntesis de celulosa. Los lípidos juegan un papel crucial en el metabolismo bioquímico, pues hacen parte de los componentes de membrana y en conjunto con las proteínas de membrana, determinan la selectividad diferencial para el transporte de iones y otros compuestos. Independiente del genotipo y del desarrollo de los frutos, en la medida que transcurrió el tiempo, hubo mayores valores de *RI* para este compuesto, lo cual refleja su síntesis. De la misma manera mayores valores fueron observados en *F1*, seguidos de *F2* y *F3* respectivamente, que estaría de acuerdo con la edad, de tal forma que los frutos de mayor desarrollo no lo sintetizan en mayor escala, ya que su estructura y anatomía está definida.

La dinámica observada en hojas y frutos, básicamente en los primeros compuestos formados por *F* como almidones y azúcares, se verá reflejada en la acumulación de materia seca. La síntesis de celulosa se pudo observar en los frutos de menor desarrollo, seguida por los frutos tipo dos, los cuales, y de acuerdo con la curva sigmoide de crecimiento, deben aún sintetizar este metabolito hasta alcanzar su máximo peso seco.

Por último, las respuestas diferenciales observadas entre genotipos en algunas de las variables evaluadas, tanto en el experimento dos como el tres, permitirán la generación de nuevos experimentos con el fin de confirmar si a través del estudio de la eficiencia en el uso del carbono, es posible detectar de manera temprana genotipos más eficientes en el uso de éste recurso, que permitan el incremento de la productividad del cultivo, y por ende, la mejor calidad de vida de los caficultores colombianos.